

INSTITUTO CARLOS CHAGAS

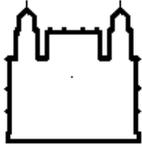
Doutorado em Biociências

**EXPORTAÇÃO DE RNA MENSAGEIRO EM *Trypanosoma cruzi*:
ANÁLISE FUNCIONAL DE Hel45**

ALEXANDRE HARUO INOUE

CURITIBA – PR

2015



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO CARLOS CHAGAS

Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia

ALEXANDRE HARUO INOUE

**EXPORTAÇÃO DE RNA MENSAGEIRO EM *Trypanosoma cruzi*:
ANÁLISE FUNCIONAL DE HeI45**

Tese apresentada ao Instituto Carlos Chagas
como parte dos requisitos para obtenção do
título de Doutor em Biociências

Orientadores: Dra. Andréa Rodrigues Ávila
Dr. Samuel Goldenberg

CURITIBA – PR

2015

Ficha catalográfica elaborada pela
Biblioteca de Ciências Biomédicas/ ICICT / FIOCRUZ - RJ

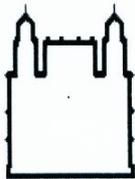
I58 Inoue, Alexandre Haruo

Exportação de RNA mensageiro em *Trypanosoma cruzi*: análise funcional de Hel45 / Alexandre Haruo Inoue. – Curitiba, 2015.
xviii, 137 f. : il. ; 30 cm.

Tese (Doutorado) – Instituto Carlos Chagas, Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia, 2015.
Bibliografia: f. 113-131

1. *Trypanosoma cruzi*. 2. Hel45. 3. eIF4AIII. 4. EJC. 5. Exportação de mRNA. 6. NES. 7. Sub2. 8. Mex67. 9. Expressão gênica. I. Título.

CDD 616.9363



Ministério da Saúde
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
Instituto Carlos Chagas
Coordenação Curso de Pós-Graduação em Biociências e
Biotecnologia



Instituto Carlos Chagas

Ata da Sessão Pública de exame de tese para obtenção do grau de Doutor em Biociências e Biotecnologia.

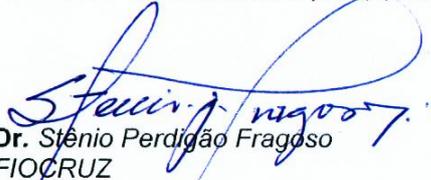
Aos 20 dias do mês de Fevereiro de dois mil e quinze, às 13:30 horas, nas dependências do Instituto Carlos Chagas/Fiocruz Paraná, reuniu-se a Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia, composta pelos Professores: Dr. Stênio Perdigão Fragoso, Dra. Daniela Fiori Gradia e Dra. Maria Carolina Quartim B.E. Sabbaga, com a finalidade de julgar a tese do candidato **Alexandre Haruo Inoue**, intitulada: **“EXPORTAÇÃO DE RNA MENSAGEIRO EM trypanosoma cruzi: ANÁLISE FUNCIONAL DE HeI45”**, sob a orientação de Andréa Rodrigues Ávila, para obtenção do grau de Doutora em Biociências e Biotecnologia. O candidato **Alexandre Haruo Inoue** teve até 45 (quarenta e cinco) minutos para a apresentação, e cada examinador teve um tempo máximo de arguição de 30 (trinta) minutos, seguido de 30 (trinta) minutos para resposta do(a) candidato(a) ou de 60 (sessenta) minutos quando houve diálogo na arguição. O desenvolvimento dos trabalhos seguiu o roteiro de sessão de defesa, estabelecido pela Coordenação do Programa, com abertura, condução e encerramento da sessão solene de defesa feito pelo Presidente **Dr. Stênio Perdigão Fragoso**. Após haver analisado o referido trabalho e arguido o candidato, os membros da banca examinadora deliberaram pela:

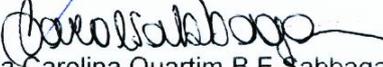
Aprovação da tese por unanimidade

Aprovação somente após satisfazer as exigências de modificações no prazo fixado pela banca (não superior a noventa dias).

Reprovação da tese

Na forma regulamentar foi lavrada a presente ata que é abaixo assinada pelos membros da banca, na ordem acima determinada, e pelo(a) candidato(a).


Prof. Dr. Stênio Perdigão Fragoso
ICC / FIOCRUZ


Prof. Dra. Maria Carolina Quartim B.E. Sabbaga
Instituto Butantan


Prof. Dra. Daniela Fiori Gradia

Universidade de Surrey

Candidato(a): 

Curitiba, 20 de Fevereiro de 2015.

Instituto Carlos Chagas – ICC – Fiocruz - PR
Rua Prof. Algacyr Munhoz Mader, 3775 – CIC
CEP 81350 010 – Curitiba – Paraná – Brasil. Tel: +55 41 3316-3230

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, à Dra. Andréa Rodrigues Ávila pela orientação, ensinamentos, paciência, apoio/motivação em todos os momentos e pela confiança no desenvolvimento desse projeto. Agradeço, principalmente, pela amizade durante todos esses anos.

Ao Dr. Samuel Goldenberg pela co-orientação, pelos ensinamentos, pelos momentos de discussão dos resultados e pela amizade.

À Mariana Serpeloni pelos longos anos de amizade, companheirismo, apoio e momentos empolgantes de discussão dos experimentos e dos resultados.

À Priscila Mazzochi Hiraiwa também pelos longos anos de amizade e companheirismo, pelas discussões dos resultados e auxílio nos experimentos, principalmente, pelas análises de Citometria de fluxo e preparação de amostras para RNA-seq.

A todos do Laboratório de Regulação da Expressão Gênica do ICC, principalmente àqueles que diretamente colaboraram com o projeto: Dra. Andréa Rodrigues Ávila, Dr. Samuel Goldenberg, Dra. Patrícia Mörking (pelas análises em PCR quantitativa), Ma. Priscila Mazzochi Hiraiwa e Dra. Mariana Serpeloni.

Ao Dr. Mark C. Field pela oportunidade de realizar parte dos experimentos desse trabalho em seu laboratório em Dundee (Universidade de Dundee, Reino Unido), pelos momentos de discussão dos experimentos e dos resultados, pelos ensinamentos e pela confiança.

Ao Dr. Newton Vidal do NIH (NCBI, Estados Unidos) por toda colaboração nas análises de filogenia, discussão e amizade.

À Dra. Maria Cristina Machado Motta da UFRJ, Dr. Maurílio Soares e Dra. Lia de Medeiros do laboratório de Biologia do ICC pela colaboração nas análises microscopia eletrônica.

Ao Dr. Fabrício Marchini e Dr. Michel Batista da plataforma de espectrometria de massas do ICC pela colaboração nas análises de proteômica de extrato total.

A todos dos laboratórios: Laboratório de Biologia Molecular de Tripanossomatídeos, principalmente ao Dr. Stenio Fragoso pela paciência na discussão dos experimentos e resultados; Laboratório de Biologia Celular;

Laboratório de Biologia Básica de Células-tronco; Laboratório de Genômica Funcional, principalmente à Ma. Cyndia Mara no preparo das amostras para RNA-seq e ao Dr. Rafael Kessler nas análises *in silico*; Laboratório de Virologia Molecular; Laboratório de Proteômica e Engenharia de Proteínas.

Ao Nilson, Vanessa, Tânia, Silvio e Sibelle por toda organização e contribuição técnica no preparo de material e de soluções, que foram fundamentais no desenvolvimento desse projeto.

A todos do ICC pelos conhecimentos compartilhados e pelos momentos de discussão científica, que fazem do instituto um ambiente favorável de produção, na geração de ciência de excelente qualidade.

À banca examinadora pelas correções e ter aceitado participar deste momento.

**À minha família: meus pais Elza e Moritaka
e meus irmãos Anderson e André.
À minha futura esposa Belize Keiko Arai.**

*If I have seen a little further
it is by standing on the shoulders
of Giants.*

Sir Isaac Newton

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	x
LISTA DE TABELAS	xii
LISTA DE ABREVIATURAS	xiii
LISTA DE SÍMBOLOS	xvi
RESUMO	xvii
ABSTRACT	xviii
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Doença de Chagas e <i>Trypanosoma cruzi</i>	1
1.1.1. Ciclo evolutivo	2
1.2. Regulação da expressão gênica de tripanossomatídeos	3
1.2.1. Transcrição e processamento do mRNA	4
1.2.2. Elementos regulatórios da expressão gênica	5
1.3. Transporte nucleocitoplasmático	8
1.3.1. Exportação de RNA do núcleo para o citoplasma	12
2. OBJETIVOS	19
2.1. Objetivo geral	19
2.2. Objetivos específicos	19
3. MATERIAIS E MÉTODOS	20
3.1. Análises de bioinformática	20
3.2. Tampões e soluções	21
3.3. Cultivo de células	21
3.3.1. <i>Trypanosoma cruzi</i>	21
3.3.2. <i>Trypanosoma brucei</i>	21
3.3.3. <i>Escherichia coli</i>	22
3.4. Meios de cultura	22
3.4.1. Meio LIT (<i>Liver Infusion Tryptose</i>)	22
3.4.2. Meio TAU (<i>Triatomine Artificial Urine</i>)	22
3.4.3. Meio TAU 3AAG pH 6,0	23
3.4.4. Meio SDM-79	23
3.4.5. Meio LB (<i>Luria – Bertani</i>)	24
3.5. Metaciclógênese <i>in vitro</i>	24
3.6. Eletroforese	24
3.6.1. Eletroforese de DNA	24
3.6.2. Eletroforese em Gel de Poliacrilamida contendo SDS (SDS-PAGE)	25
3.6.2.1. Coloração por Azul de Coomassie	26
3.6.2.2. Coloração por Nitrato de Prata	26
3.7. Clonagem molecular de sequências nucleotídicas	27
3.7.1. Extração de DNA genômico	27
3.7.2. Amplificação gênica por PCR	27
3.7.3. Clonagem entre inserto e plasmídeo	30
3.7.4. Transformação e seleção de clones recombinantes	31

3.7.4.1. Preparo das células competentes.....	31
3.7.4.2. Transformação de <i>E. coli</i>	32
3.7.4.3. Seleção de plasmídeos recombinantes.....	32
3.7.5. Extração de DNA plasmidial.....	33
3.8. Transfecção de tripanossomatídeos.....	34
3.9. Silenciamento gênico por RNA de interferência.....	35
3.10. Eletroforese em campo pulsado seguido de <i>Southern blot</i>	35
3.11. Ensaio do tipo <i>Western blot</i>	37
3.11.1. Revelação por Fosfatase Alcalina.....	37
3.11.2. Revelação por Quimioluminescência (Peroxidase).....	38
3.12. Microscopia óptica.....	38
3.12.1. Localização de proteínas.....	38
3.12.2. Localização de mRNAs através da técnica de hibridização <i>in situ</i> fluorescente (FISH).....	39
3.12.3. Coloração pelo método de panótico rápido.....	39
3.13. Microscopia ultraestrutural.....	40
3.14. Avaliação do nível de tradução por marcação metabólica.....	40
3.15. Sedimentação de polissomos através de gradiente de sacarose.....	41
3.16. Quantificação do nível de mRNA por PCR quantitativo.....	42
3.17. Quantificação do nível de proteína por abordagem proteômica.....	44
3.18. Imunoprecipitação.....	45
3.18.1. Acoplamento de <i>nanobody</i> anti-GFP a esferas magnéticas.....	45
3.18.2. Preparação de extrato proteico por <i>Cryogrinding</i>	46
3.18.3. Isolamento de complexos proteicos.....	46
3.19. Análise de dados proteômicos.....	49
4. RESULTADOS.....	52
4.1. CAPÍTULO 1.....	52
4.2. CAPÍTULO 2.....	69
4.2.1. Análise de filogenia de Hel45.....	69
4.2.2. Genética reversa de Hel45: Nocaute gênico em <i>T. cruzi</i> e RNAi em <i>T. brucei</i> ... 74	74
4.2.3. Identificação de complexos proteicos contendo Hel45, Sub2 e Crm1.....	89
5. DISCUSSÃO.....	100
6. REFERÊNCIAS.....	113
7. APÊNDICES.....	132
8. ANEXOS.....	137

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – CICLO EVOLUTIVO DO <i>Trypanosoma cruzi</i>	3
FIGURA 2 – ELEMENTOS REGULATÓRIOS TRANS DA EXPRESSÃO GÊNICA EM EUCARIOTOS.....	6
FIGURA 3 – RNA REGULONS DE EUCARIOTOS.....	7
FIGURA 4 – ESTRUTURA E COMPONENTES DO COMPLEXO DO PORO NUCLEAR.....	9
FIGURA 5 – CONTROLE DO TRANSPORTE PELO PORO NUCLEAR.....	10
FIGURA 6 – IMPORTAÇÃO E EXPORTAÇÃO PELO PORO NUCLEAR MEDIADO POR RECEPTORES E GRADIENTE DE GTP.....	12
FIGURA 7 – RECRUTAMENTO DOS HETERODÍMEROS Mex67 E Mtr2(p15) PARA A EXPORTAÇÃO DO mRNA (EM MAMÍFEROS).....	14
FIGURA 8 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DAS FUNÇÕES DE EJC.....	15
FIGURA 9 – VIAS DE EXPORTAÇÃO DE mRNA EM FUNGOS E METAZOÁRIOS.....	16
FIGURA 10 – MAPA GENÉTICO DO VETOR DE ENTRADA pDONR™221 DA PLATAFORMA GATEWAY.....	30
FIGURA 2.1. – QUADRO CONTENDO ID DAS PROTEÍNAS RNA HELICASE ORTÓLOGAS DE DBP5/DDX19, MEMBROS EIF4A (EIF4AI, EIF4AII E EIF4AIII), DHH1/DDX6 E SUB2/DDX39/UAP56 EM ESPÉCIES REPRESENTATIVAS DA FILOGENIA.....	70
FIGURA 2.2 – FILOGENIA DE Hel45.....	73
FIGURA 2.3 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DOS CASSETES UTILIZADOS PARA O NOCAUTE DE Hel45 EM <i>Trypanosoma cruzi</i>	74
FIGURA 2.4 – ANÁLISE POR ELETROFORESE DE DNA GÊNOMICO PARA CONFIRMAÇÃO DO NOCAUTE DE Hel45 POR PCR.....	75
FIGURA 2.5 – ANÁLISE DO NOCAUTE DE Hel45 EM <i>T. cruzi</i>	77
FIGURA 2.6 – EFEITOS DO NOCAUTE DE Hel45.....	78
FIGURA 2.7 – EFEITO DO NOCAUTE DURANTE A DIFERENCIAÇÃO.....	80
FIGURA 2.9 – ANÁLISE DO EFEITO DE RNAI CONTRA TbHel46 NA LOCALIZAÇÃO DE mRNA EM <i>T. brucei</i>	83
FIGURA 2.10 – ANÁLISE DOS EFEITOS DO KO DE Hel45 EM <i>T. cruzi</i> NA DISTRIBUIÇÃO DE mRNAs E NA TRADUÇÃO EM PARASITAS.....	84
FIGURA 2.11 – PROTEÔMICA COMPARATIVA DE PARASITAS SELVAGENS E NOCAUTES.....	86
FIGURA 2.12 – QUANTIFICAÇÃO DE mRNA E AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DE GRÂNULOS EM PARASITAS NOCAUTES.....	88
FIGURA 2.13 – COMPONENTES PROTEICOS DOS COMPLEXOS CONTENDO Sub2 DE <i>Trypanosoma cruzi</i>	91
FIGURA 2.14 – DOMÍNIOS FUNCIONAIS DE API5 DE <i>Trypanosoma cruzi</i>	93
FIGURA 2.15 – COMPONENTES PROTEICOS DOS COMPLEXOS CONTENDO Crm1 DE <i>Trypanosoma cruzi</i>	95
FIGURA 2.16 – COMPONENTES PROTEICOS DOS COMPLEXOS CONTENDO Hel45 DE <i>Trypanosoma cruzi</i>	97

FIGURA 2.17 – DOMÍNIO FUNCIONAL DE PROTEÍNA CONTENDO DOMÍNIO NT2-like DE <i>Trypanosoma cruzi</i>	98
FIGURA 2.18 – DIAGRAMA DE VENN DAS IMUNOPRECIPITAÇÕES.....	99
FIGURA 2.19 – DOMÍNIO FUNCIONAL DE PROTEÍNA CONTENDO DOMÍNIO TcFOP DE <i>Trypanosoma cruzi</i>	99
FIGURA 5.1 – MECANISMO DE ATIVAÇÃO DE NMD EM MAMÍFEROS.....	108
FIGURA 5.2 – MODELO ESQUEMÁTICO DE POSSÍVEIS FUNÇÕES DE Hel45 em <i>Trypanosoma cruzi</i>	111

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – SOLUÇÕES DE PREPARO DE GEL SDS-PAGE.....	26
TABELA 2 – OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES DAS REAÇÕES DE AMPLIFICAÇÃO.....	29
TABELA 3 – OLIGONUCLEOTÍDEOS UTILIZADOS NAS ANÁLISES DE qPCR.....	43
TABELA 2.1. – ANÁLISE COMPARATIVA ENTRE DIFERENTES GRUPOS DE PROTEÍNAS DA FAMÍLIA DE RNA HELICASES DEAD-BOX.....	
	72
TABELA 2.2. – IDENTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS ORTÓLOGAS DE NTF2-like.....	98

LISTA DE ABREVIATURAS

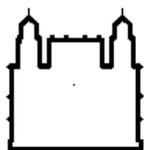
ADP	- Adenina difosfato
AP	- Fosfatase alcalina (<i>Alkaline Phosphatase</i>)
ATP	- Adenina trifosfato
BCIP	- 5-bromo 4-cloro 3-indolil fosfato
BLAST	- <i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
BRIJ58	- Polioxietileno 20-cetil éter
BSA	- Albumina de Soro Bovino (<i>Bovine Serum Albumin</i>)
CDC	- Centros de Controle e Prevenção de Doenças (<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>)
CHAPS	- 3-[(3-colamidopropil)-dimetil-amônio]-1-propano-sulfonato
CPN	- Complexo de poro nuclear
C-terminal	- Carboxi-terminal
DAPI	- 4', 6-Diamidino-2-fenilindol
Dbp	- Proteína DEAD-box (<i>DEAD-box protein</i>)
DIC	- Contraste por Interferência Diferencial
<i>Dm</i>	- <i>Delphis marsupialis</i>
DMP	- Dimetil pimelimidato dihidroclorídrico
DNA	- Ácido Desoxirribonucleico
dNTP	- Desoxirribonucleotídeo trifosfatados
DO	- Densidade Ótica no comprimento de onda (λ)
DTT	- Ditioneitol
EDTA	- Ácido etileno-diamino-tetracético (<i>Ethylenediaminetetraacetic Acid</i>)
EJC	- Complexo de junção de éxon (<i>Exon junction complex</i>)
G418	- Antibiótico análogo à neomicina
GFP	- Proteína verde fluorescente (<i>Green Fluorescent Protein</i>)
HEPES	- (N-[2-hidroxietil]-1-piperazino N'-[2-ácido etanosulfônico])
IBMP	- Instituto de Biologia Molecular do Paraná
ICC	- Instituto Carlos Chagas
IF	- Ensaio de Imunofluorescência
IPTG	- Isopropil- β -D-tio-galactopiranosídeo
KO	- Nocaute (<i>Knockout</i>)
LB	- Meio Luria-Bertani

LIT	- <i>Liver Infusion Tryptose</i>
miRNA	- Micro RNA
LMB	- Leptomicina B
ME	- Mini-exon
MP	- Minipreparação de plasmídeo
mRNA	- RNA mensageiro (<i>messenger RNA</i>)
mRNP	- Ribonucleoproteína mensageira
NBT	- <i>Nitro-Blue-Tetrazolium</i>
NES	- Sinal de Exportação Nuclear (<i>Nuclear export signal</i>)
NLS	- Sinal de Localização Nuclear (<i>Nuclear localisation sequence</i>)
NMD	- Degradação mediada sem sentido (<i>Nonsense mediated decay</i>)
NP-40	- Nonil fenoxi polietoxietanol
N-terminal	- Amino-terminal
Nup	- Nucleoporina
PBS	- Solução Salina tamponada com Fosfato (<i>Phosphate Buffered Saline</i>)
PCR	- Reação em cadeia da polimerase
PFGE	- Gel de eletroforese em campo pulsado (<i>Pulsed-field gel electrophoresis</i>)
PDB	- Banco de dados de proteína (<i>Protein Data Bank</i>)
PMSF	- Fluoreto de fenil metil sulfonil
PTC	- Códon prematuro de terminação (<i>Premature termination codon</i>)
RNA	- Ácido Ribonucleico
RNase	- Ribonuclease
RNAi	- RNA de interferência
rRNA	- RNA ribossomal
SDS	- Dodecil sulfato de sódio (<i>Sodium dodecyl sulfate</i>)
SDS-PAGE	- Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS (<i>Sodium dodecyl sulfate-polyacrilamide gel electrophoresis</i>)
SFB	- Soro fetal bovino
SSC	- Tampão NaCl-Citrato de Sódio (<i>Standard Saline-Citrate</i>)
SL-RNA	- <i>Spliced leader RNA</i>
TAU	- Urina artificial de Triatomíneo (<i>Triatomine Artificial Urine</i>)
TBE	- Tampão Tris-Boro-EDTA
TE	- Tampão Tris-EDTA

TEMED	- N, N, N', N'- Tetrametiletilenodiamina
TREX	- Complexo de <u>T</u> ranscrição/ <u>E</u> xportação
Tris	- Tris (hidroximetil) aminometano
tRNA	- RNA transportador
Tween 20	- Polioxietilenosorbitol monolaurato
UTR	- Regiões não traduzidas (<i>Untranslated region</i>)
UV	- Ultravioleta
WHO	- Organização Mundial da Saúde (<i>World Health Organization</i>)
WT	- Linhagem selvagem (<i>Wild-type</i>)

LISTA DE SÍMBOLOS

°C	- Grau Celsius
%	- Porcentagem
cm	- Centímetro
μCi	- Microcurie
μF	- Microfaraday
μg	- Micrograma
μl	- Microlitro
μM	- Micromolar
g	- Grama (unidade de medida de massa)
g	- Aceleração de gravidade
kb	- 1000 bases
Mpb	- Megabases
kDa	- Quilodalton
l	- Litro
M	- Molar
mA	- Miliampere
MDa	- Megadalton
mg	- Miligrama
ml	- Mililitro
mM	- Milimolar
ng	- Nanograma
nm	- Nanômetro
rpm	- Rotação por minuto
pb	- Pares de bases
pH	- Potencial hidrogeniônico
pmol	- Picomol
TBq	- Terabecquerel
U	- Unidade
V	- Volt



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO CARLOS CHAGAS

EXPORTAÇÃO DE RNA MENSAGEIRO EM *Trypanosoma cruzi*:

ANÁLISE FUNCIONAL DE Hel45

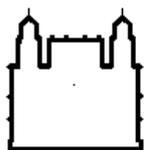
RESUMO

TESE DE DOUTORADO

Alexandre Haruo Inoue

Durante seu processo de evolução, os tripanossomatídeos desenvolveram características distintas de outros eucariotos em relação à sua biologia. Desde a transcrição do DNA no núcleo até tradução do RNA mensageiro no citoplasma, estão envolvidos fatores às vezes únicos, que atuam principalmente na regulação gênica pós-transcricional. Entretanto, o transporte de mRNA do núcleo para o citoplasma é pouco compreendido nesses parasitas. Análises de genômica comparativa revelaram que somente algumas proteínas envolvidas na exportação estão conservadas em espécies divergentes, como tripanossomatídeos, indicando que essa via pode apresentar fatores diferentes, ainda não identificados, ou ela não é tão especializada e complexa como a via descrita em mamíferos e leveduras. Por isso, a função de componentes da via de exportação de mRNA, buscando entender como esse processo funciona em parasitas merece ser melhor investigada. Este trabalho tem como foco o estudo de uma proteína de 45 kDa de *T. cruzi*, denominada de Hel45, que apresentou alta similaridade com RNA helicases de transporte, envolvidas com a exportação de mRNA em mamíferos e leveduras. Uma análise de filogenia determinou que Hel45 é a ortóloga da eIF4AIII, uma RNA helicase componente de *Exon junction complex* (EJC) em células de mamíferos. No entanto, até o momento, não existem publicações descrevendo homólogos de eIF4AIII em tripanossomatídeos. Dados experimentais demonstraram que Hel45 é uma proteína que migra entre o núcleo e o citoplasma devido a um sinal de exportação nuclear (NES) funcional. Esta migração depende da transcrição ativa e do receptor de exportação de mRNA Mex67. As análises fenotípicas de uma linhagem de *T. cruzi* nocaute de Hel45 mostraram que a ausência da proteína não foi letal ao parasita, mas resultou no atraso do crescimento e diminuiu a taxa de metaciclo gênese *in vitro*. Apesar de não causar o acúmulo de mRNA no núcleo, o nocaute afetou a tradução, pois diminuiu a formação de polissomos e a taxa de tradução. No entanto, este efeito não altera a expressão de proteínas de modo geral, visto que ensaios de proteômica revelaram que o nocaute interfere com a expressão de apenas algumas poucas proteínas, indicando que Hel45 pode estar relacionada à modulação da expressão de genes específicos ou existe uma via/proteína compensatória na ausência de Hel45. Foram obtidas evidências de que Hel45 está presente em complexos ribonucleoproteicos que não estão associados aos polissomos e análises de proteômica identificaram as proteínas destes complexos que devem interagir com Hel45. Dados obtidos até o momento mostraram que Mago e Y14, proteínas de EJC que interagem com eIF4AIII, podem estar associadas com Hel45, assim como, Sub2 e FOP, que são proteínas essenciais para o recrutamento de Mex67 durante exportação de mRNA em outras células eucarióticas. Outra proteína que pode estar interagindo com Hel45 é uma exclusiva de tripanossomatídeos, que contém um domínio NTF2-like, típico de receptores de exportação. Assim, o conjunto de dados obtidos indica que Hel45 está envolvida com o metabolismo de mRNA em *T. cruzi*. Desta forma, tem sustentação a hipótese de que seu papel seria semelhante à eIF4AIII, agindo como um fator que se associa ao mRNA já durante a etapa transcrição/processamento e que é exportado para o citoplasma.

Palavras-chave: *Trypanosoma cruzi*, Hel45, eIF4AIII, EJC, exportação de mRNA, NES, Sub2, Mex67, expressão gênica.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

CARLOS CHAGAS INSTITUTE

MESSENGER RNA EXPORT IN *Trypanosoma cruzi*:

FUNCTIONAL ANALYSIS OF Hel45

ABSTRACT

PhD THESIS

Alexandre Haruo Inoue

During evolution, trypanosomatids have developed particular biological features as compared to other eukaryotes. From DNA transcription to translation of messenger RNA, unique factors can be involved mainly in the post-transcriptional regulation of gene expression. However, the transport of mRNA from the nuclei to the cytoplasm is not well-known in these parasites. Genomic comparative analysis has shown that only few proteins involved in mRNA export are conserved in divergent species, like trypanosomatids, indicating that this route can comprise distinct factors that have been not yet identified, or alternatively it is not specialized and complex as the route described in mammals and yeast. For this reason, the function of components from mRNA export to understand how it works in parasites deserves further investigation. The present work focuses on the study of a 45 kDa *T. cruzi* protein, named Hel45, which is highly similar to shuttling proteins that are involved in mRNA export in mammals and yeast. A phylogenetic analysis demonstrated that Hel45 is the orthologue of eIF4AIII, a RNA helicase that is one of the components of exon junction complex (EJC) in mammal's cells. However, as yet it has been no description of eIF4AIII homologues in trypanosomatids. Experimental data have demonstrated that Hel45 shuttles between nucleus and cytoplasm due to a functional nuclear export signal (NES). This shuttling is dependent on active transcription and on the mRNA export by receptor Mex67. Phenotypic analyses using *T. cruzi* lineage for Hel45 knockout have shown that the lack of the protein was not lethal for the parasite but affected the growth and metacyclogenesis *in vitro*. Despite the absence of mRNA accumulation into the nucleus, the knockout affected the translation by decreasing the amount of polysomes and the translation rate. Nevertheless, this effect did not change the overall protein expression, since the proteomic assays revealed that the knockout affected the expression of only some proteins, indicating that Hel45 might modulate the expression of specific genes. Evidences indicated that Hel45 is present in ribonucleoprotein complexes that are not associated to polysomes; proteomic analysis of these complexes allowed the identification of proteins that can interact with Hel45. So far, the data obtained have shown that Mago and Y14, proteins of EJC that interact with eIF4AIII, can be associated with Hel45, as well as Sub2 and FOP, that are essential proteins for recruitment of Mex67 during mRNA export in other eukaryotic cells. Another protein that can interact with Hel45 is a specific protein of trypanosomatids and it contains a NTF2-like domain, typical of export receptors. Taking together, tempting to speculate that Hel45 is involved in mRNA metabolism in *T. cruzi*. It would be interesting investigating whether it has a similar role of eIF4AIII, acting as a factor that associates to mRNA during transcription/processing that is exported to cytoplasm.

Keywords: *Trypanosoma cruzi*, Hel45, eIF4AIII, EJC, mRNA export, NES, Sub2, Mex67, gene expression.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Doença de Chagas e *Trypanosoma cruzi*

Na escala evolutiva, *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) é um protozoário flagelado altamente divergente de outros eucariotos. Existem algumas hipóteses de que seu ancestral foi introduzido possivelmente na América há cerca de 7 a 10 milhões de anos derivado de um tripanossomatídeo de morcego (HAMILTON *et al.*, 2012). Desde então, o parasita se adaptou perfeitamente em outros hospedeiros e a ciclos evolutivos bastante complexos envolvendo a transmissão da doença de Chagas para o homem (STEVERDING, 2014). Atualmente, essa enfermidade negligenciada ainda é um grave problema de saúde pública, pois é estimado que de 8 a 10 milhões de pessoas estejam infectadas, sendo endêmica principalmente na América Latina (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2015). No Brasil, estima-se que existam entre dois e três milhões de indivíduos infectados (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2015).

A infecção com *T. cruzi* ocorre pelo contato direto da mucosa ou lesões de pele no homem. A transmissão vetorial acontece durante o repasto sanguíneo quando as excretas contaminadas de triatomíneos (principalmente da espécie *Triatoma infestans*) atingem, geralmente, o local da picada (RASSI *et al.*, 2010). Desse modo, os dados epidemiológicos de maior incidência na América Latina estão relacionados a casos de transmissão vetorial em virtude da distribuição regional do triatomíneo vetor (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2015). Casos de países não endêmicos são, geralmente, registrados por outros mecanismos de transmissão (CLAYTON, 2010), como a transfusão sanguínea, doação de órgãos, transmissão congênita, via oral por ingestão de alimentos contaminados e, ocasionalmente, por acidentes laboratoriais (RASSI *et al.*, 2010). Os estágios da doença de Chagas envolvem as fases aguda e/ou crônica. A fase aguda pode ser assintomática, sem qualquer manifestação clínica, entretanto, quando sintomática, os indivíduos infectados apresentam alta parasitemia, febre, cefaléia, edema inflamatório (chagoma, sinal de Romana) no local da penetração do parasita (RASSI *et al.*, 2010). Algumas manifestações clínicas podem ser fatais: inchaço do fígado e do baço, inflamação dos gânglios linfáticos, coração, meninge e cérebro (COURA & BORGES-PEREIRA, 2012). Sem um tratamento, a evolução do estado agudo pode resultar na forma crônica. Os pacientes podem permanecer nessa fase de modo assintomático indefinidamente no organismo (CLAYTON,

2010), em níveis mínimos, até o paciente chagásico apresentar complicações cardíacas (megacárdio), digestivas (megaesôfago e megacólon) e raramente, neurológicas (RASSI *et al.*, 2010; COURA & BORGES-PEREIRA, 2012).

Ainda não existe vacina contra a doença de Chagas e o tratamento é baseado nos quimioterápicos Nifurtimox e Benzonidazol com resultados satisfatórios quando tratado na fase aguda (RASSI *et al.*, 2010). Geralmente, essas drogas geram alta toxicidade celular e efeitos colaterais (CLAYTON, 2010): anorexia, náusea, vômitos, cefaleia, sintomas psicóticos, dermatites (MAYA *et al.*, 2007). Atualmente, o tratamento através do Nifurtimox foi interrompido no Brasil e apenas o Benzonidazol é encontrado. Dessa forma, o desenvolvimento de fármacos mais seguros e eficazes e, conseqüentemente, a compreensão de mecanismos essenciais da biologia de *T. cruzi* são urgentemente necessários (RASSI *et al.*, 2010), tendo como alvo as vias de potencial importância para a sobrevivência do parasita (CHATELAIN, 2015).

1.1.1. Ciclo evolutivo

A doença de Chagas foi descoberta pelo médico brasileiro Carlos Chagas em 1909 em um trabalho científico considerado único na história da medicina (RASSI *et al.*, 2010): sua pesquisa descreveu detalhadamente aspectos clínicos do primeiro caso relatado da enfermidade, além do agente etiológico, do transmissor vetorial e do modo de transmissão (CHAGAS, 1909). Durante o ciclo evolutivo (TYLER & ENGMAN, 2001), os parasitas na forma tripomastigota metacíclica são eliminados junto às fezes e urina no momento em que o triatomíneo hematófago se alimenta no hospedeiro vertebrado. Estas formas infectivas podem entrar em contato com lesões de pele ou mucosas do hospedeiro mamífero, invadir células adjacentes e conseqüentemente, acometer o homem. No ambiente celular, os tripomastigotas alteram sua forma para um modelo arredondado e sofrem encurtamento do flagelo com mudança na posição do cinetoplasto (uma região de condensação do DNA mitocondrial organizado em maxicírculos e minicírculos), assumindo a forma intracelular amastigota, que se multiplica por divisão binária. Após se replicarem, os amastigotas iniciam um processo inverso de transformação, ou seja, reestruturam-se para a forma tripomastigota e, posteriormente, com a ruptura da membrana plasmática da célula hospedeira, alcançam a corrente sanguínea e se alastram para

outras células. O triatomíneo, ao ingerir sangue de animais ou do homem infectado com *T. cruzi* durante o hematofagismo, possibilita a proliferação do parasita no lúmen do trato gastrointestinal sob a forma não infectiva epimastigota e este, quando migra para o reto, é exposto ao estresse nutricional, aderindo à glândula retal. Neste local, transforma-se morfogeneticamente na forma infectiva tripomastigota metacíclica, processo de transformação celular denominado de metaciclogênese. O ciclo é reiniciado com um novo repasto alimentar do inseto (Figura 1).

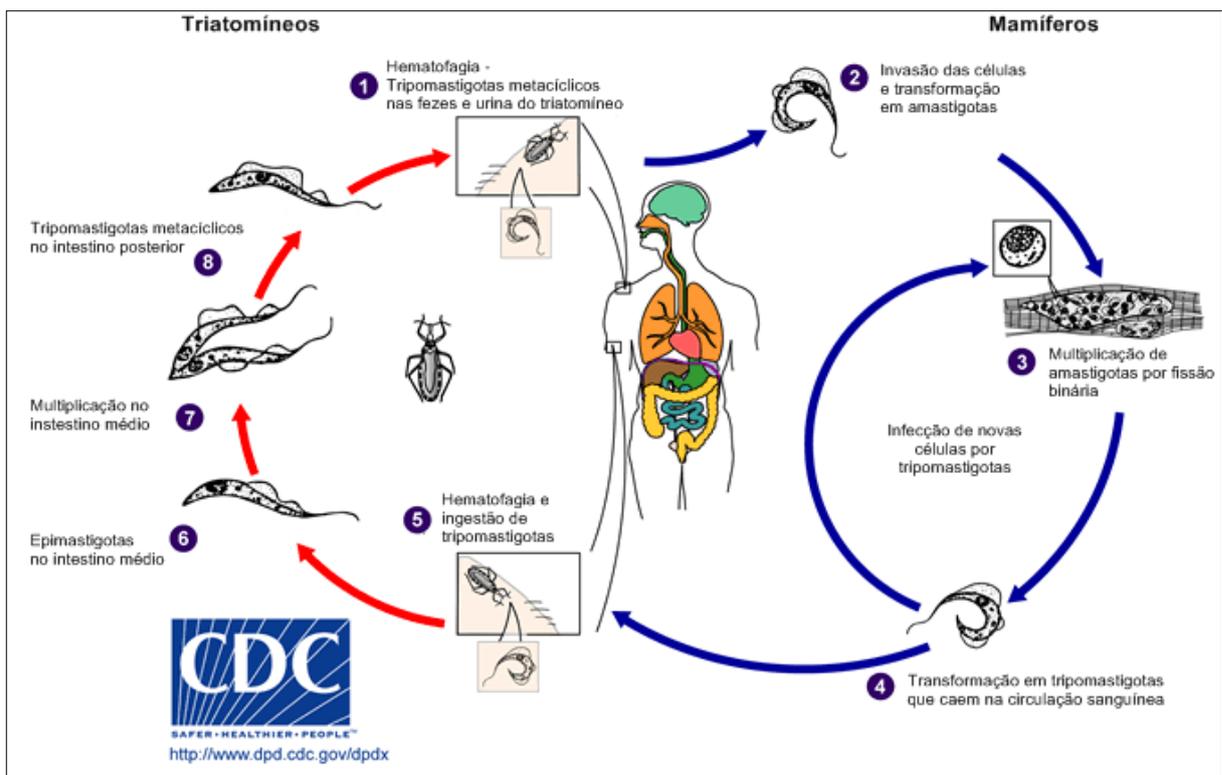


FIGURA 1 - CICLO EVOLUTIVO DO *Trypanosoma cruzi*. Ver texto para descrição detalhada.
 Fonte: Modificado de <<http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/TrypanosomiasisAmerican.htm>>

1.2. Regulação da expressão gênica de tripanossomatídeos

Em decorrência da alternância de hospedeiros durante o ciclo biológico, a adaptação do *T. cruzi* às condições encontradas em cada ambiente resulta em alterações morfológicas e, principalmente, moleculares como consequência de uma reprogramação na expressão de genes e vias metabólicas (BARTHOLOMEU *et al.*, 2014). Desse modo, estes parasitas necessitam de um controle refinado e rápido da expressão gênica. Da transcrição do DNA no núcleo à tradução do RNA mensageiro (mRNA) no citoplasma, eles desenvolveram mecanismos moleculares com

características muito peculiares e distintas de outros eucariotos, envolvendo fatores de regulação, algumas vezes, únicos (KRAMER & CARRINGTON, 2011). Dentre esses processos estão: a transcrição policistrônica (JOHNSON *et al.*, 1987; MARTINEZ-CALVILLO *et al.*, 2003), o processamento do pré-mRNA por *trans-splicing* e poliadenilação (AGABIAN, 1990; PREUßER, 2012) e a edição do pré-RNA mitocondrial que permite a inserção e remoção de resíduos de uridina dentro de transcrito para reconstituição de uma fase aberta de leitura (STUART *et al.*, 1997; HAJDUK & OCHSENREITER, 2010). Além disso, em algumas espécies de tripanossomatídeos, a transcrição de alguns genes codificadores de proteína ocorre pela RNA polimerase (RNA pol) I, como no caso das glicoproteínas variantes de superfície (VSG - *variant surface glycoprotein*) e da proteína PARP (*procyclic acidic repetitive protein*) (RUDENKO *et al.*, 1991; LEE & PLOEG, 1997).

1.2.1. Transcrição e processamento do mRNA

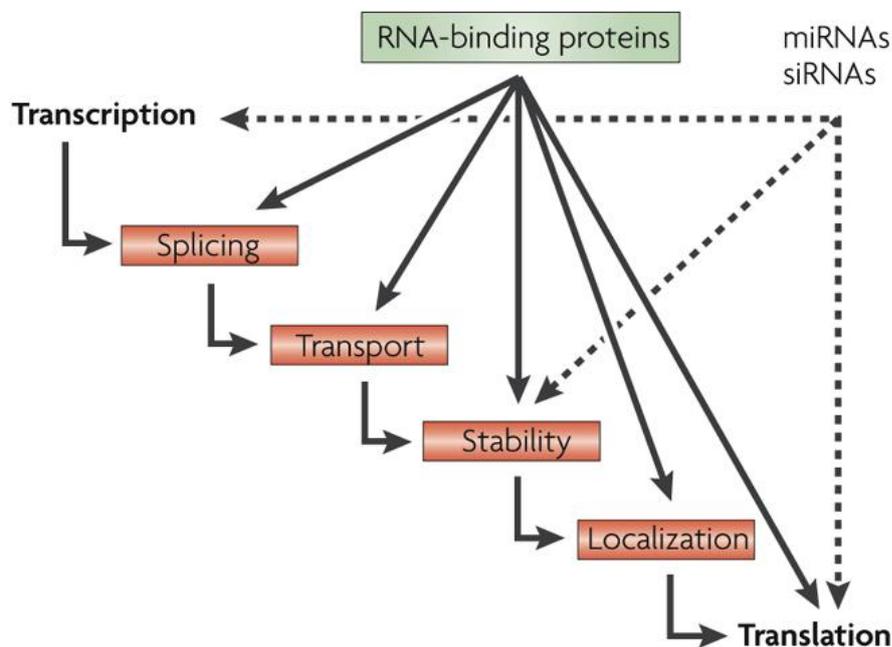
Em eucariotos, em geral, a RNA pol II reconhece e se liga às sequências promotoras consenso dentro do genoma para transcrição individual de cada gene codificador de proteína (ALBERTS *et al.*, 2002). Esse processo resulta em um transcrito primário ou pré-mRNA apresentando sequências de introns e exons. Este pré-RNA é processado pela adição do cap 7-metilguanossina (m7G cap) na extremidade 5' do RNA, remoção de introns por *cis-splicing* e adição da cauda de adenina (poli-A) na extremidade 3', gerando o mRNA maduro (ISKEN & MAQUAT, 2007). Em tripanossomatídeos, as regiões promotoras reconhecidas pela RNA polimerase I e algumas pela RNA pol III foram identificadas e caracterizadas (RUDENKO *et al.*, 1991; ZOMERDIJK *et al.*, 1991; RUDENKO *et al.*, 1995; YAN *et al.*, 1999). Entretanto, não existem sequências consenso para RNA pol II para quase todos os genes. Uma vez que ambas as fitas do DNA podem ser transcritas (MARTINEZ-CALVILLO *et al.*, 2003), a RNA pol II apresenta baixa especificidade e assim a transcrição pode ser iniciada indiscriminadamente no genoma e formar longos RNAs policistrônicos sem íntrons (McANDREW *et al.*, 1998). Esses pré-mRNAs policistrônicos são processados por poliadenilação na extremidade 3' e *trans-splicing* na extremidade 5' pela adição de uma sequência líder de aproximadamente 39 nucleotídeos chamada de mini-exon (ME) ou *spliced leader* (SL) (PARSONS *et al.*, 1984) contendo um cap hipermetilado conhecido como

“cap4” (ZAMUDIO *et al.*, 2009). As unidades monocistrônicas maduras de tripanossomatídeos, diferentemente do que ocorre em procariotos, codificam proteínas não necessariamente pertencentes a uma mesma via metabólica e o nível de mRNAs maduros é modulado por eventos pós-transcricionais.

1.2.2. Elementos regulatórios da expressão gênica

Devido à ausência de mecanismos de controle do início da transcrição, os elementos regulatórios de tripanossomatídeos atuam principalmente na regulação pós-transcricional e são extremamente importantes para expressão de genes em resposta a sinais extracelulares, que desencadeiam a progressão do ciclo celular, a diferenciação entre formas evolutivas, resistência a drogas, etc (WESTON *et al.*, 1999; DI NOIA *et al.*, 2000; COUGHLIN *et al.*, 2000; BARTHOLOMEU *et al.*, 2002; DE GAUDENZI *et al.*, 2003; BARKER *et al.*, 2004; VILLARREAL *et al.*, 2005; DA SILVA *et al.*, 2006; SINGH *et al.*, 2007; JÄGER *et al.*, 2008; GENTIL *et al.*, 2009; RODRIGUES *et al.*, 2010). Os elementos regulatórios atuam coordenando e direcionando os mRNAs alvos para as maquinarias de eventos pós-transcricionais, como o processamento, exportação para o citoplasma, estabilidade, estocagem e tradução (Figura 2). Esse controle da expressão gênica envolve a interação de elementos *cis-acting* do RNA e fatores *trans-acting*. Os componentes *cis-acting* são identificados geralmente por distintas estruturas secundárias em regiões não traduzidas, denominados de UTRs (UTR – *untranslated region*) regulando a abundância do mRNA. A maioria desses elementos está em sequências 3' UTRs (MYUNG *et al.*, 2002) e é reconhecida por fatores *trans-acting* (Figura 2). Dentre esses fatores, estão distintas subclasses de RNAs não-codificantes (ncRNA), como microRNAs e siRNA, que apresentam importantes funções regulatórias em eucariotos. ncRNAs foram caracterizadas em *Leishmania* (DUMAS *et al.*, 2006) e análises de genômica comparativa demonstraram que muitos estão conservados entre os genomas de tripanossomatídeos (DONIGER *et al.*, 2010). Entretanto, a maquinaria de RNA de interferência está ausente em *T. cruzi* (DaROCHA *et al.*, 2004; EL-SAYED *et al.*, 2005) indicando que estes elementos podem estar relacionados a outros sistemas de maior complexidade da expressão gênica nesses parasitas (ARAÚJO & TEIXEIRA, 2011).

Outros elementos *trans-acting* são representados por proteínas de ligação a RNA (RBP – *RNA-binding proteins*), que têm sido identificados com a análise dos conteúdos de complexos ribonucleoproteicos (RNP ou mRNP – *messenger ribonucleoprotein*) a partir do advento de técnicas de análise em larga escala (OEFFINGER *et al.*, 2007; ALVES *et al.*, 2010; LEPPEK *et al.*, 2013; VALDÉS *et al.*, 2014). RBPs também interagem com outras proteínas, mas associam-se principalmente aos elementos *cis-acting* de RNAs nascentes desde a transcrição através de domínios específicos (revisado em GLISOVIC *et al.*, 2008). Algumas RBPs de tripanossomatídeos têm sido caracterizadas: Proteínas de ligação a poli(A) (PABP) (BATISTA *et al.*, 1994), proteínas pertencentes à família TcUBP, compreendido por seis membros (DE GAUDENZI *et al.*, 2003; D'ORSO & FRASCH, 2002; NOÉ *et al.*, 2008; CASSOLA & FRASCH, 2009), proteínas Pumilio com domínios PUF (DALLAGIOVANNA *et al.*, 2005; CARO *et al.*, 2006; DALLAGIOVANNA *et al.*, 2008; ARCHER *et al.*, 2009), proteínas com domínio *zinc finger* (ESPINOSA *et al.*, 2003; MÖRKING *et al.*, 2004; ALVES *et al.*, 2014) e RNA helicases (HOLETZ *et al.*, 2007).



Nature Reviews | **Genetics**

FIGURA 2 - ELEMENTOS REGULATÓRIOS TRANS DA EXPRESSÃO GÊNICA EM EUKARIOTOS.

Estão representados os diferentes passos da regulação da expressão gênica (da transcrição à tradução), os quais os fatores trans, como proteínas de ligação a mRNA (RBPs) e microRNAs e siRNAs, estão relacionados.

Fonte: KEENE, 2007.

A coordenação eficiente da expressão de mRNAs em função das necessidades da célula levou ao conceito da organização em eucariotos de um sistema análogo aos operons de procaríotos, denominado operons pós-transcricionais ou regulons de RNA. Isso indica que RBPs podem se ligar a sequências curtas ou a elementos estruturais do mRNA (elementos cis) e regular coordenadamente subconjuntos de transcritos que codificam proteínas funcionalmente relacionadas, controlando o destino do mRNA (KEENE, 2007) (Figura 3). Muitas evidências apontam para a existência dos regulons em tripanossomatídeos: TcUBP1 associa-se a mRNAs que codificam para proteínas metabólicas (NOÉ *et al.*, 2008); TcRBP3, com mRNAs que codificam proteínas ribossomais (NOÉ *et al.*, 2008); TbDRBD3, com mRNA que codificam proteínas de membrana (ESTEVEZ, 2008; STERN *et al.*, 2009); TbPUF9 com transcritos que corregulam proteínas de ciclo celular (ARCHER *et al.*, 2009) e TcZC3H39 se liga a mRNAs que codificam proteínas ribossomais e do complexo citocromo C oxidase durante o estresse nutricional (ALVES *et al.*, 2014).

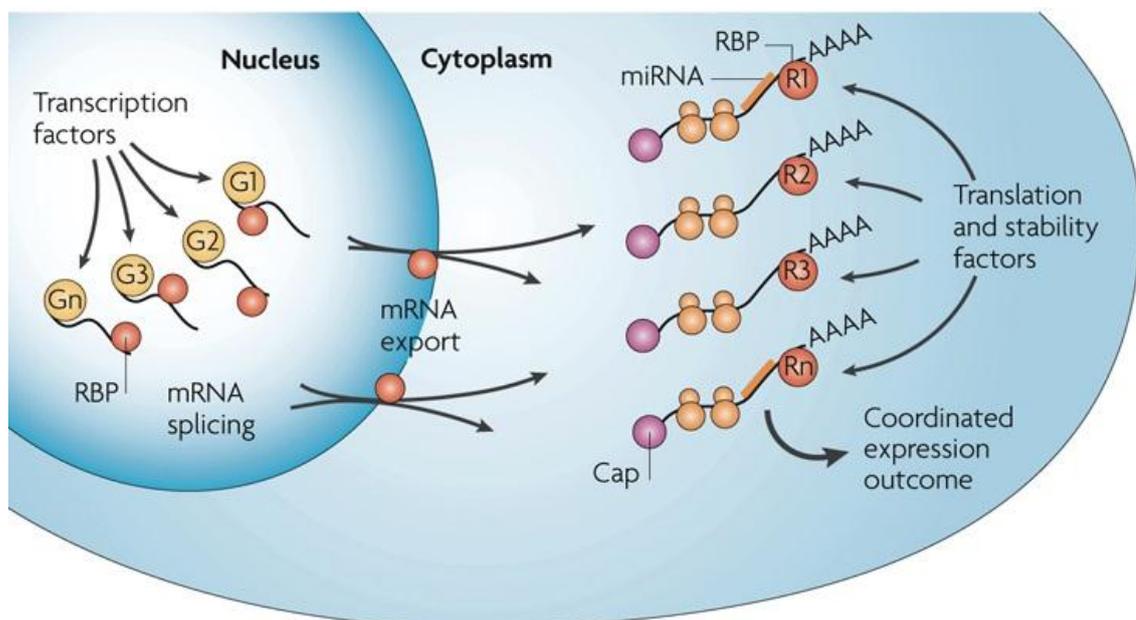
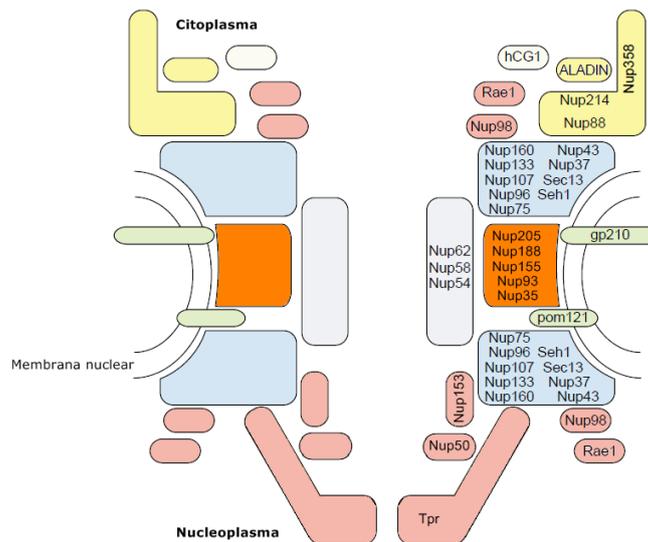


FIGURA 3 – RNA REGULONS DE EUCARIOTOS. Diferentes fatores (G1 a Gn) ativam a transcrição de mRNAs que são transportados para o citoplasma. Nesse compartimento, os operons pós-transcricionais ou regulons regulam principalmente a estabilidade e a tradução, garantindo a expressão corregulada de um conjunto de mRNAs funcionalmente relacionados à uma mesma via metabólica. RBPs (R1 a Rn) e microRNAs se ligam aos mRNAs e atuam nesses regulons.
 FONTE: Adaptado de KEENE, 2007.

1.3. Transporte nucleocitoplasmático

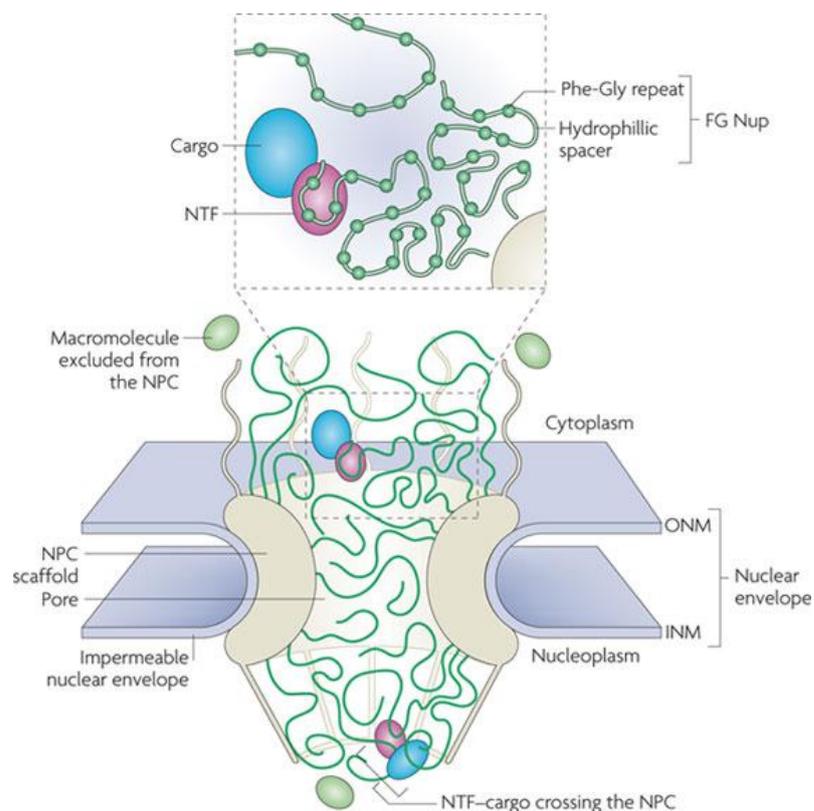
Com base nos dados funcionais expostos e considerando o grande número de proteínas RBPs, muitas das quais não apresentam ortólogos em outros eucariotos (ARCHER *et al.*, 2009), as vias regulatórias podem ocorrer de modo diferente em tripanossomatídeos (GAZESTANI *et al.*, 2014). O transporte de moléculas entre o núcleo e o citoplasma ainda é pouco compreendido nesses parasitas, não obstante ser a exportação de mRNA um processo de controle bastante importante na manutenção da expressão gênica em outros eucariotos (STRAMBIO-DE-CASTILLIA *et al.*, 2010). Proteínas são sintetizadas no citoplasma e necessitam ser levadas ao núcleo, como, por exemplo, os fatores de transcrição. Por outro lado, RNAs são transcritos no núcleo e são exportados ao citoplasma para possibilitar a sua tradução em proteínas. Esse equilíbrio dinâmico de trocas de diferentes moléculas entre ambos os compartimentos é facilitado por complexos de poro nuclear (CPNs). A estrutura do CPN é altamente organizada e consiste em um canal transportador central composto por anéis internos, externos e *linkers*. Associado a esta estrutura central estão oito filamentos citoplasmáticos assimétricos e oito filamentos nucleares que se intersectam em um anel distal, denominado de cesta nuclear (Figura 4) (revisado em STRAMBIO-DE-CASTILLIA *et al.*, 2010). CPNs são compostos por proteínas denominadas de nucleoporinas (Nups) e por proteínas associadas às Nups (ROUT *et al.*, 2000). Esses componentes têm sido caracterizados em fungos e vertebrados (Figura 4) e são evolutivamente conservados (MANS *et al.*, 2004; TRAN & WENTE, 2006), incluindo em eucariotos altamente divergentes como tripanossomatídeos (DeGRASSE *et al.*, 2009; NEUMANN *et al.*, 2010).



Localização	Nucleoporinas					
	Metazoários	Fungos	<i>T. brucei</i> (DeGrasse <i>et al.</i> (2009), Neumann <i>et al.</i> (2010))			
			Anotação	Número de Identificação		
Filamentos citoplasmáticos (fibrilas)	Aladin	-	Aladin (TbNup48)	Tb11.02.2120		
	Nup214 (CAN)	Nup159	-			
	MP44	Nup53	-			
	Rip1/Rab/hCG1	Nup42	-			
	Nup358 (Ranbp2, Rbp2)	-	-			
	Nup88	-	-			
	Ran-Gap1	-	-			
	Ubc9 (Ube2l)	Ubc9	-			
Anel externo	Complexo Nup107-160	Nup107	Complexo Nup84	Nup84	TbNup89	Tb11.02.0460
		Nup75		Nup85	TbNup82*	Tb09.211.4780
		Nup160		Nup120	TbNup132*	Tb927.7.2300
		Nup133		Nup133	TbNup109*	Tb11.01.7630
		Nup96		C-Nup145	-	
		Nup43		-	-	
		Nup37		-	-	
		Seh1		Seh1	TbSeh1	Tb11.01.5410
Anel interno	Complexo Nup155	Complexo Nup170	Nup157 / Nup170	TbNup144	Tb10.6k15.2350	
			Nup188	TbNup225	Tb1927.4.2880	
			Nup192	TbNup181*	Tb10.6k15.1530	
			Nup59	-		
			Nup93	Nic96	TbNup96	Tb10.6k15.3670
Ancoramento / transmembrana	Ndc1	Ndc1	-			
	-	pom34	-			
	-	pom152	-			
	gp210 (pom210)	-	-			
Canal central	Nup62	Nsp1p	TbNup53a	Tb11.01.7200		
	Nup58/Nup45	Nup49	TbNup98*	Tb927.3.3180		
	Nup54	Nup57	TbNup62	Tb927.4.5200		
Cesta nuclear	Nup98	N-Nup145 / Nup116 / Nup100	TbNup158	Tb11.03.0140		
	Rae1	Gle2	TbGle2	Tb09.160.2360		
	Nup153	Nup1	-			
	Nup50 (Npap60L)	Nup2	-			
	Tpr1	Mlp1	TbMlp1 / TbNup110*	Tb11.03.0810		
	Tpr2	Mlp2	TbMlp2 / TbNup92*	Tb09.160.0340		

FIGURA 4 – ESTRUTURA E COMPONENTES DO COMPLEXO DO PORO NUCLEAR. O complexo do poro nuclear está esquematicamente representado e consiste de um canal transportador central composto por anéis externos, internos e *linker*, além de filamentos citoplasmáticos assimétricos. Os filamentos nucleares se intersectam em um anel distal, denominado de cesta nuclear. Os homólogos de nucleoporinas de fungos, vertebrados e tripanossomatídeos estão indicados. *Sequências excluídas em Neumann *et al.* (2010) pela baixa similaridade estrutural com nucleoporinas conhecidas.

Nups do canal central são ricas em repetições contendo os aminoácidos fenilalanina e glicina e, assim, são denominadas de Nups FG. Esses motivos estão presentes em um terço das Nups e formam regiões hidrofóbicas intrinsicamente desordenadas dentro o poro, que permitem a interação de alta especificidade e afinidade transiente com receptores de transporte (Figura 5), regulando seletivamente a passagem de moléculas (STRAMBIO-DE-CASTILLIA *et al.*, 2010). Nups dos filamentos citoplasmáticos e da cesta nuclear também contém repetições FG e servem como os primeiros pontos de interação, direcionando os processos de transporte nucleocitoplasmática. Nups FG também foram identificadas em tripanossomatídeos (TbNup53a, TbNup98, TbNup62, TbNup158, TbMlp1 / TbNup110, TbMlp2 / TbNup92) além de alguns poucos fatores de transporte, o que sugere que os mecanismos de transloção nuclear podem estar conservados (DeGRASSE *et al.*, 2009).



Nature Reviews | Molecular Cell Biology

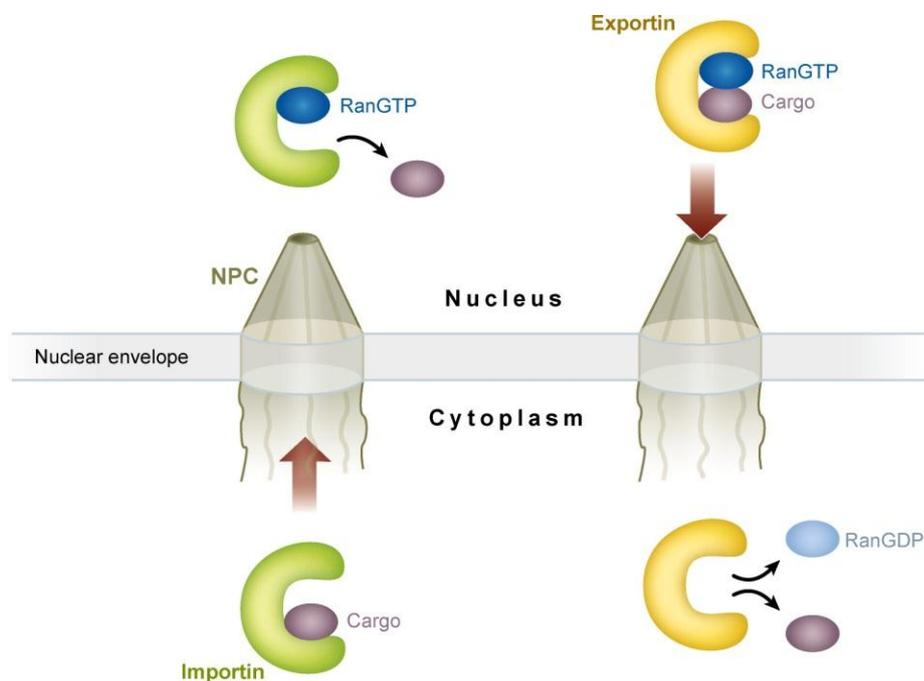
FIGURA 5 – CONTROLE DO TRANSPORTE PELO PORO NUCLEAR. No complexo do poro nuclear, o núcleo e o citoplasma são conectados por um canal, composto de Nups filamentosas e flexíveis ricas em aminoácidos hidrofóbicos fenilalanina e glicina (Nups FG). Estas interagem com fatores de transporte nuclear (NTFs) e permitem a passagem de cargas entre os dois compartimentos.

FONTE: STRAMBIO-DE-CASTILLIA *et al.*, 2010

A passagem pelo CPN de sais, nucleotídeos livres e pequenas moléculas requeridas para síntese de DNA e RNA no núcleo, ocorre passivamente por difusão. Contudo, macromoléculas em trânsito, denominadas de carga, devem ser transportadas pelo poro nuclear com a assistência de receptores específicos a partir de vias de sinalização e, geralmente, dependentes de gradientes de energia (COOK *et al.*, 2007). Cargos devem conter sinais específicos que indiquem seu transporte como NLS (NLS – *nuclear localisation sequences*) e NES (*nuclear export signal*) que são sequências de aminoácidos necessários, respectivamente, para a importação e exportação, de proteínas maiores que 40 kDa. Esses receptores são conhecidos como NTFs (NTF - *nuclear transport factor*) (Figura 5) e são proteínas da família β -carioferina, subdivididas em importinas e exportinas. Importinas associam-se com o cargo no citoplasma, através do NLS rico em aminoácidos básicos, para o transporte para o interior nuclear (BAGLEY *et al.*, 2000). Já para a exportação de moléculas, exportinas reconhecem o NES que consiste de uma região de aproximadamente 10 aminoácidos com 4-5 resíduos hidrofóbicos predominantemente de leucina, mas que também podem apresentar isoleucina, valina, metionina ou fenilalanina (LA COUR *et al.*, 2003) resultando na sequência consenso L_{xxx}L_{xx}L_xL (L corresponde a leucina e x, a um aminoácido hidrofóbico qualquer) (LA COUR *et al.*, 2004). Desse modo, receptores de transporte são capazes de interagir com as Nups FG, permitindo o direcionamento do transporte do cargo pelo CPN.

De modo geral, a interação desses receptores de transporte com o cargo requer a atuação de uma GTPase denominada de Ran. O ciclo de modificação molecular de RanGTP promove o direcionamento do transporte (Figura 6). Ran localiza-se predominantemente no interior nuclear e, individualmente, apresenta baixa atividade de hidrolisar GTP (forma RanGDP). Por isso, é estimulada por outras moléculas como RanGAP (GAP – *GTPase-activating protein*) e RanGEF (GEF – *Guanine nucleotide exchange factor*, também denominada de RCC1). Assim, durante a importação, o cargo é liberado no núcleo pela associação da importina com RanGTPase na forma GTP-ligante (RanGTP). Durante a exportação, acontece o processo inverso. O reconhecimento e translocamento de cargo e receptor de exportação é mediado pela hidrólise de RanGTP, liberando, ao final, RanGDP na face citoplasmática. Ademais, fatores adicionais como RanBPs (RanBP – *Ran binding protein*) contribuem para a ativação de Ran, atuando como cofator de RanGAP; e receptor de transporte NTF2, não pertencente a família de carioferinas e

necessário para o retorno de RanGDP ao núcleo após exportação do cargo (COOK *et al.*, 2007).



 Cook A, et al. 2007.
Annu. Rev. Biochem. 76:647–71

FIGURA 6 – IMPORTAÇÃO E EXPORTAÇÃO PELO PORO NUCLEAR MEDIADO POR RECEPTORES E GRADIENTE DE GTP. Para a importação, cargos contendo um NLS se associam a importinas e são liberados dentro do núcleo quando RanGTP se associa. Para a exportação, exportinas interagem com NES de cargos na presença de RanGTP e quando GTP é hidrolisado, o cargo é liberado no citoplasma.

FONTE: COOK *et al.*, 2007

1.3.1. Exportação de RNA do núcleo para o citoplasma

O receptor de exportação de proteínas mais estudado é a exportina Crm1 (FORNEROD *et al.*, 1997; DONG *et al.*, 2009), que também pode estar envolvida no transporte de RNAs mensageiros em alguns momentos específicos da fisiologia celular (NEVILLE & ROSBASH, 1999; WATANABE *et al.*, 1999; HEROLD *et al.*, 2003; SCHÜTZ *et al.*, 2006), como por exemplo, no transporte de transcritos que não sofreram *splicing* ou que foram parcialmente processados, em casos de infecção pelo vírus da imunodeficiência humana – HIV (SCHÜTZ *et al.*, 2006). Cuevas *et al.* (2005) sugerem que Crm1 também pode estar associada à exportação de mRNAs em tripanossomatídeos, mas até o momento, nenhuma evidência detalhada foi obtida sobre os mecanismos de exportação nestes parasitas.

Em leveduras e mamíferos, a via de exportação da maioria dos mRNAs necessita de um receptor independente de RanGTP e não pertencente a família β -carioferina, denominado de Mex67 (em mamíferos, é conhecido por TAP ou NXF1), que forma dímero com a proteína cofatora Mtr2 (também denominada de p15). Além de receptores de transporte, o mRNA é exportado dentro mRNPs (NAKIELNY & DREYFUSS, 1999; WEIS, 2002; LUNA, 2008) e a fase inicial de formação desses complexos envolve duas maquinarias que podem recrutar o receptor Mex67: TREX (TREX – *Transcription/export*), durante a transcrição/processamento, ou o EJC (EJC - *Exon Junction Complex*) no processamento por *cis-splicing* (Figura 7). Em fungos, o complexo TREX acopla a transcrição à exportação (FISCHER *et al.*, 2002; JIMENO *et al.*, 2002; HUERTAS & AGUILERA, 2003; RONDON *et al.*, 2003; ABRUZZI *et al.*, 2004), quando o complexo THO, que atua na elongação da RNA pol II (FISCHER *et al.*, 2002; JIMENO *et al.*, 2002), recruta os fatores diméricos Sub2 e Yra1 (em mamíferos, chamada de UAP56 e Aly, respectivamente) para o mRNA nascente (ZENKLUSEN *et al.*, 2002; ABRUZZI *et al.*, 2004) (Figura 7). Em humanos, o recrutamento de TREX acontece pela maquinaria de *splicing* (MASUDA *et al.*, 2005) e também pela associação com proteína CBP80 do complexo CBC (CBC – *Cap binding complex*) do *cap* 5' (CHENG *et al.*, 2006; NOJIMA *et al.*, 2007; CHI *et al.* 2013) (Figura 9). Alternativamente, o dímero Sub2-Yra1 pode ser recrutado ao mRNA pela associação com complexo EJC (GATFIELD *et al.* 2001; LE HIR *et al.* 2001) (Figura 7).

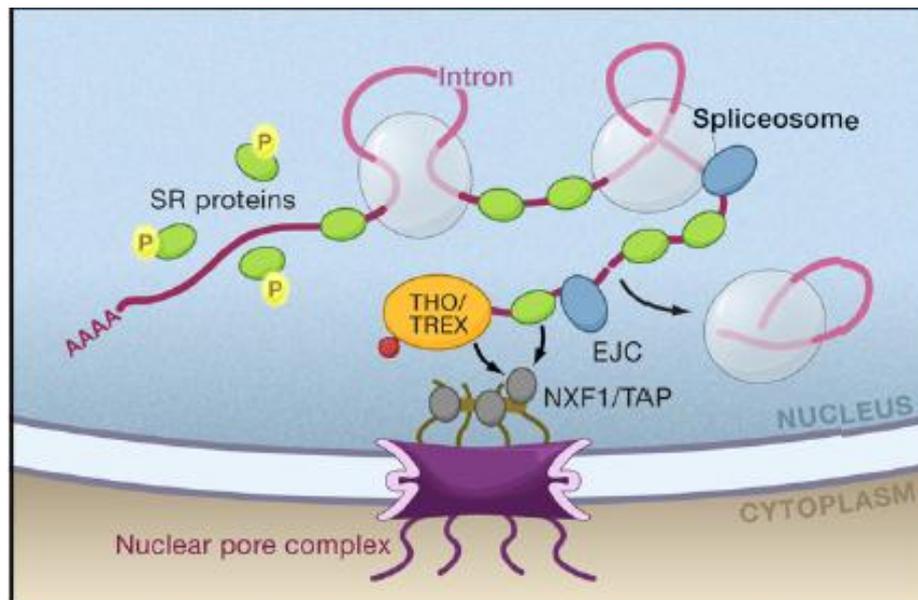
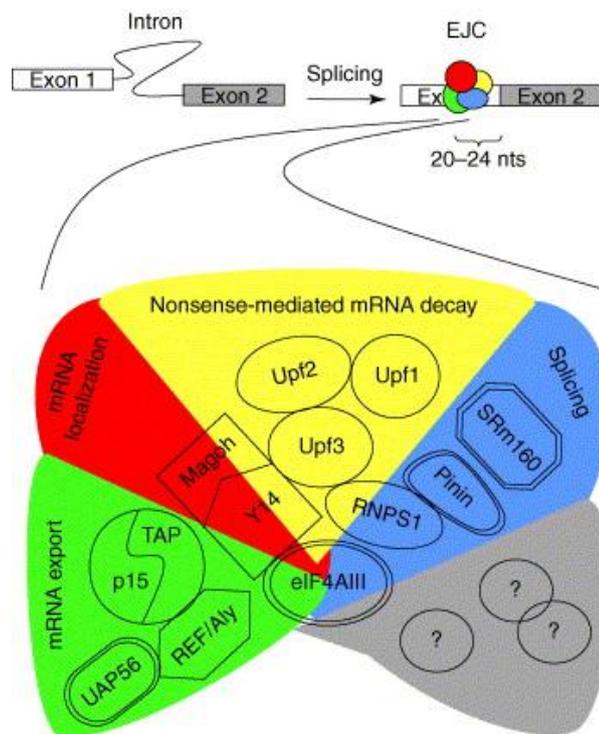


FIGURA 7 – RECRUTAMENTO DOS HETERODÍMEROS Mex67 E Mtr2(p15) PARA A EXPORTAÇÃO DO mRNA (EM MAMÍFEROS). A maquinaria de exportação pode ser recrutada por dois processos: através do complexo TREX ou pelo EJC, que é recrutado ao mRNA pelo spliceossomo. Ambas as maquinarias favorecem a ligação de Sub2, que é o fator responsável por recrutar NXF1/TAP (Mex67 em fungos). Este é o receptor que interage com o poro nuclear e permite a passagem de mRNPs para o citoplasma.

Em mamíferos, o complexo proteico EJC – composto principalmente por eIF4AIII, MLN51 (também chamado BTZ/Barentsz) e o heterodímero Y14-MAGOH (ou Mago/Mago-nashi) – é depositado pela maquinaria de *cis-splicing* (Figuras 8 e 9) em uma região de 20-24 nucleotídeos à montante das junções entre exons no mRNA processado (LE HIR *et al.*, 2000). EJC forma um complexo mRNP estável (TANGE *et al.*, 2005; ANDREOU & KLOSTERMEIER, 2013), atuando como uma plataforma para ligação transiente de diversos fatores que podem definir o destino do mRNA para vias específicas (TANGE *et al.*, 2004) (Figura 8). Essa estabilidade faz com que EJC fique associado ao transcrito desde o processamento dentro do núcleo e somente seja removido do mRNP no citoplasma durante a tradução pela proteína PYM na passagem do ribossomo pelo mRNA (GEHRING *et al.*, 2009). Entre os fatores que se ligam a EJC estão proteínas responsáveis pela: degradação do mRNA mediado pelo NMD (NMD - *Nonsense mediated decay*) (GEHRING *et al.*, 2003); localização do mRNA no citoplasma (LE HIR *et al.*, 2001; PALACIOS *et al.*, 2004); tradução (NOTT *et al.*, 2004); e exportação (Figura 8). Entre as proteínas da via de exportação de mRNA, o EJC interage principalmente com o dímero Sub2-Aly (KATAOKA *et al.*, 2000; LUO *et al.*, 2001) e FOP (SINGH *et al.*, 2012). Logo, a exportação de mRNA está acoplada a outros processos de regulação da expressão gênica, que incluem o processamento e também a transcrição (Figuras 7 e 9).



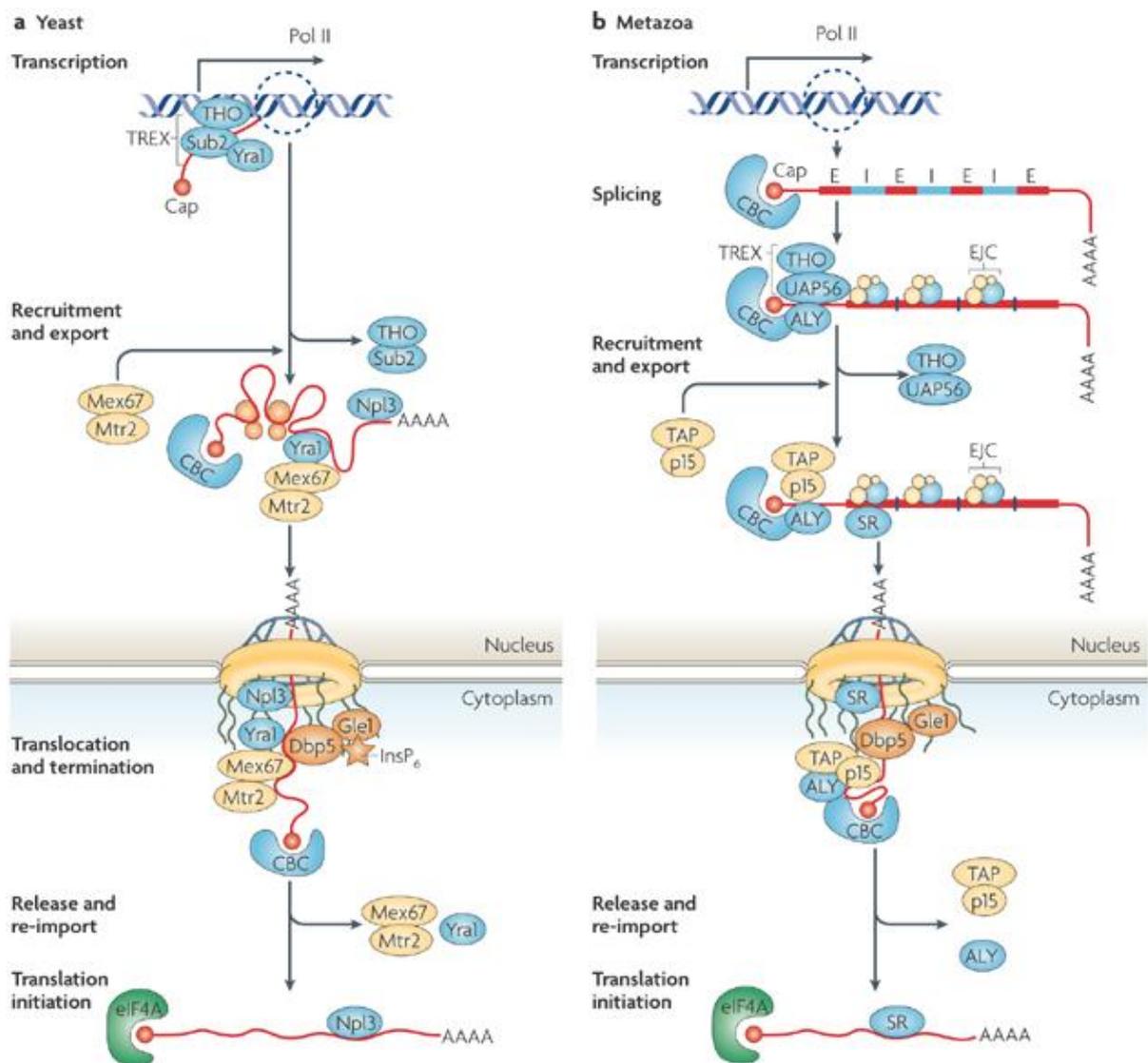
Current Opinjon in Cell Biology

FIGURA 8 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DAS FUNÇÕES DE EJC. EJC é depositado ao mRNA na posição a montante de 20 a 24 nucleotídeos das regiões de junção entre exon e eIF4AIII e uma proteína central desse complexo. EJC muitas vezes funciona como uma plataforma para direcionamento do mRNA para diversas vias, dependendo dos fatores associados. As proteínas foram agrupadas em cores de acordo com as funções biológicas
 FONTE: TANGE *et al.*, 2004.

A RNA helicase Sub2 é o fator responsável pelo recrutamento do receptor heterodimérico Mex67-Mtr2 (STRÄSSER & HURT, 2001), o que torna o complexo mRNP competente ao processo de exportação (Figuras 7 e 9). Mex67-Mtr2 carrega o mRNA pelo poro nuclear decorrente da associação com Nucleoporinas e, quando alcança a face citoplasmática, o mRNP é desmontado pela RNA helicase Dbp5 (LUND & GUTHRIE, 2005). Uma vez no citoplasma, o mRNA pode alcançar a maquinaria de tradução ou, então, como em mamíferos, o complexo EJC associado ao transcrito pode atuar no recrutamento de fatores responsáveis pelo controle de qualidade, degradando mRNAs mal processados ou com códons prematuros de terminação (PTC), durante o processo de NMD (FERRAIUOLO *et al.*, 2004).

Além dos fatores descritos, proteínas adicionais associam-se ao transcrito (Figura 9) para a eficiente exportação do mesmo. Proteínas SR (ricas em Serina e Arginina) são essenciais para exportação de mRNA por atuarem como moléculas adaptadoras após sofrerem reações específicas de fosforilação ou desfosforilação durante associação com Mex67 (HUANG *et al.*, 2003) (Figuras 7 e 8). Em fungos, a

proteína SR Npl3 associa-se à cauda poliadenilada do mRNA e migra entre o núcleo e o citoplasma (LEE *et al.*, 1996) dependendo de seu estado de fosforilação (GILBERT *et al.*, 2001).



Nature Reviews | Molecular Cell Biology

FIGURA 9 – VIAS DE EXPORTAÇÃO DE mRNA EM FUNGOS (A) E METAZOÁRIOS (B). Ver texto para descrição detalhada.

FONTE: KÖHLER & HURT, 2007

Apesar dos fatores e mecanismos de exportação de mRNA serem bem descritos em mamíferos e leveduras, poucos dados foram publicados até o momento em parasitas. Análises de genômica comparativa realizadas pelo nosso grupo revelaram que somente algumas proteínas envolvidas na exportação de mRNA são filogeneticamente conservadas em organismos divergentes, como por exemplo

tripanossomatídeos, propondo que essa via possui fatores diferentes ainda não identificados ou que o(s) mecanismo(s) possa(m) acontecer de modo mais simplificado: sem a presença de componentes especializados como ocorre em fungos ou mamíferos (Figuras 9) (SERPELONI *et al.*, 2011a). Entretanto, algumas proteínas de exportação ortólogas foram caracterizadas e diferenças estruturais foram observadas em relação às proteínas de fungos ou mamíferos, possivelmente determinando suas peculiaridades funcionais, como o caso da RNA helicase Sub2 (SERPELONI *et al.*, 2011b) e do receptor Mex67 (SCHWEDE *et al.*, 2009; DOSTALOVA *et al.*, 2013). Embora altamente conservada em sequência e estrutura predita, a Sub2 de *T. cruzi* (TcSub2) foi incapaz de substituir funcionalmente sua ortóloga em fungos por ensaios de complementação (SERPELONI *et al.*, 2011b). Em relação a Mex67, a estrutura da proteína em tripanossomatídeos difere da dos outros eucariotos: ela contém um domínio *zinc finger* na porção N-terminal que não existe nos ortólogos em outros eucariotos (KRAMER *et al.*, 2010) e que é essencial para função da proteína na exportação de mRNA (DOSTALOVA *et al.*, 2013); ela não apresenta os domínios do tipo NTF2-like e UBA (UBA - *ubiquitin-associated*), que estão presentes em fungos e mamíferos (DOSTALOVA *et al.*, 2013), e são importantes para a interação com Nups FG para facilitar a passagem pelo poro nuclear (STEWART, 2010). Por fim, Dostalova *et al.* (2013) identificaram duas proteínas interagindo com TbMex67, que apresentam função na via de exportação: TbMtr2, o que sugere a conservação do complexo heterodimérico Mex67-Mtr2 (como ocorre em fungos e mamíferos); e uma proteína denominada de IMP1, bastante similar à importina Transportina 2. A diminuição da expressão tanto de Sub2 (SERPELONI *et al.*, 2011b) quanto de Mex67 (SCHWEDE *et al.*, 2009; DOSTALOVA *et al.*, 2013) após indução do mecanismo de RNAi em *T. brucei* resultou em acúmulo nuclear de mRNAs poliadenilados e letalidade ao parasita. Essas evidências indicam que as vias de transporte são essenciais para a sobrevivência desses organismos divergentes e que acontecem diferentemente de humanos e fungos, uma vez que distintos componentes podem estar associados.

Ante o exposto, uma proteína de 45 kDa de *T. cruzi* denominada de Hel45 se mostrou bastante interessante como um elemento regulatório *trans-acting*, uma vez que motivos funcionais característicos da família de RNA helicases DEAD-box estão presentes em sua sequência. Em trabalho descrito pelo nosso grupo, foi apresentado que Hel45 apresenta similaridade a Dbp5 de fungos (SERPELONI *et al.*, 2011a). Desse modo, esse projeto visou a caracterização aprofundada da função

de Hel45 com enfoque na via de transporte de mRNA do núcleo para o citoplasma em *T. cruzi* e também na investigação de seu papel em vias pós-transcricionais essenciais ao parasita, principalmente através de abordagens de genética reversa. Adicionalmente, a identificação de proteínas associadas a Hel45 em complexos por ensaios de proteômica foi uma estratégia fundamental na identificação de fatores específicos que poderão ser estudados para, assim, contribuir no entendimento da via de exportação de mRNA nesses parasitas, levando a definição futura de possíveis alvos de quimioterápicos.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Caracterização funcional de Hel45 na via de exportação de RNA mensageiro em *Trypanosoma cruzi*.

2.2. Objetivos específicos

- Verificar se Hel45 pode ser um fator que migra entre núcleo e citoplasma;
- Analisar o fenótipo causado pelo nocaute de Hel45 em *T. cruzi* e silenciamento da expressão da proteína ortóloga em *T. brucei*;
- Identificar proteínas associadas a complexos contendo Hel45.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Análises de bioinformática

Buscas de bioinformática foram realizadas usando o algoritmo BLASTP (ALTSCHUL *et al.*, 1997) padrão e as proteínas ortólogas foram identificadas através do critério de *reciprocal best hit* (RBH). Assim, sequências proteicas de referência (RefSeq) de espécies representativas da filogenia eucariótica foram obtidas dos bancos de dados do NCBI (NCBI - *National Center for Biotechnology Information*). Foram analisadas as proteínas das espécies *Saccharomyces cerevisiae* (Fungi), *Homo sapiens* (Metazoa), *Dictyostelium discoideum* (Amoebozoa), *Arabidopsis thaliana* (Plantae), *Plasmodium falciparum* (Chromalveolata), *Toxoplasma gondii* (Chromalveolata), *Trypanosoma cruzi* (Excavata), *Trypanosoma brucei* (Excavata) e *Leishmania major* (Excavata). Os domínios das proteínas foram identificados através do programa hmmscan do pacote HMMER (EDDY, 1998), buscando contra a coleção de modelos ocultos de Markov (*Hidden Markov Models* - HMM) disponíveis no banco de dados do Pfam, versão 27.0 (FINN *et al.*, 2014). O alinhamento de múltiplas sequências ortólogas foi realizado no diagnóstico dos nove motivos conservados das RNA helicases da família DEAD-box utilizando o programa MUSCLE (EDGAR *et al.*, 2004). A análise filogenética foi realizada utilizando uma aproximação do método de Máxima Verossimilhança (*maximum likelihood*) implementada no programa FastTree 2.1 (PRICE *et al.*, 2010), utilizando o modelo WAG. A árvore filogenética foi desenhada utilizando o programa FigTree v1.4 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>). Para o cálculo de similaridade e identidade entre os pares de sequências de aminoácidos foi utilizado o programa needle do pacote EMBOSS (RICE *et al.*, 2000), que permite o melhor alinhamento global entre duas sequências de proteínas.

Para a predição de domínios na identificação de proteínas hipotéticas, foram utilizados: a ferramenta hmmscan do pacote HMMER (EDDY, 1998) e o programa Phyre2 (KELLEY & STERNBERG, 2009).

3.2. Tampões e soluções

- Tampão NKM – NaCl 40 mM; KCl 5 mM; MgCl₂ 2 mM; Hepes 10 mM pH 7,4.
- Tampão PBS 10X – NaCl 0,137 M; KCl 2,7 mM; Na₂HPO₄ x 7H₂O 4,3 mM; KH₂PO₄ 1,5 mM.
- Tampão PSG – Fosfato de sódio 75 mM pH 8,0; NaCl 65 mM, Glicose 1,5%.
- Tampão TE – Tris-HCl 10 mM pH 8,0; EDTA 1 mM pH 8,0.
- Tampão TKMC – Tris-HCl 10 mM pH 7,4; MgCl₂ 10 mM e KCl 300 mM.
- Tampão TKMP – Tris-HCl 10 mM pH 7,4; MgCl₂ 10 mM e KCl 500 mM.
- Tampão SSC 20 X – Citrato de sódio 0,3 M pH 7,0 e NaCl 3 M.
- Solução de Denhardt – Ficoll 0,02 % (tipo 400, Pharmacia), polivinilpirrolidona 0,02 % (Sigma) e BSA 0,02 % (Albumina sérica bovina).

3.3. Cultivo de células

3.3.1. *Trypanosoma cruzi*

Formas epimastigotas de *T. cruzi* cepa *Dm28c* (CONTRERAS *et al.*, 1988) foram mantidas em culturas axênicas em meio LIT [(LIT - *liver infusion tryptose*) ver item 3.4.1] a 28°C. Formas tripomastigotas metacíclicas foram obtidas através de metaciclogênese *in vitro*, como descrito em Contreras *et al.* (1985) e Bonaldo *et al.* (1988). Os procedimentos dessa metodologia estão no item 3.5.

3.3.2. *Trypanosoma brucei*

Formas procíclicas *Trypanosoma brucei* cepa 427 (CROSS & MANNING, 1973) foram mantidos em cultura axênica em meio SDM-79 (ver item 3.4.4) suplementado com 10% de soro fetal bovino (BRUN & SCHONENBERGER, 1979), a 28 °C e passagens a cada três dias com inóculo de 5 x 10⁵ células/ml. Para a linhagem de *T. brucei* 29-13 (WIRTZ *et al.*, 1999) o meio foi suplementado também com antibióticos Higromicina 50 µg/ml e G418 15 µg/ml. Esta linhagem celular expressa o repressor da tetraciclina e a T7 RNA polimerase para utilização em ensaios de RNA de interferência.

3.3.3. *Escherichia coli*

A linhagem de *Escherichia coli* utilizada foi:

- Linhagem DH5 α TM – {F- *recA1 endA1 hsdR17* (*rk⁻, mk⁺*) *supE44* λ - *thi-1 gyrA96 relA1*}.

As bactérias foram cultivadas em meio de cultura LB (ver item 3.4.5) 37 °C durante 16 horas. Para a estocagem, células em fase de crescimento exponencial foram mantidas em igual volume de glicerol a -70 °C e em nitrogênio líquido.

3.4. Meios de cultura

3.4.1. Meio LIT (*Liver Infusion Tryptose*)

Infusão de fígado.....	5,00 g/l
NaCl	4,40 g/l
KCl.....	0,40 g/l
Glicose	2,20 g/l
Triptose	5,00 g/l
Fosfato dibásico de sódio	11,56 g/l
Extrato de levedura	15,00 g/l
Hemina.....	0,02 g/l
Soro fetal bovino.....	10%
Penicilina	10000 U

3.4.2. Meio TAU (*Triatomine Artificial Urine*)

NaCl	190 mM
CaCl ₂	2 mM
KCl.....	17 mM
MgCl ₂	2 mM
Tampão fosfato pH 6,0	8 mM

3.4.3. Meio TAU 3AAG pH 6,0

Meio TAU suplementado com:

Glicose	10 mM
Ácido L-aspártico.....	2 mM
Ácido L-glutâmico.....	50 mM
L-Prolina.....	10 mM

3.4.4. Meio SDM-79

MEM (<i>Minimum Essential Medium</i>)	7,00 g/l
Meio 199.....	2,00 g/l
MOPS.....	5,00 g/l
Hepes	8,00 g/l
Glicose	1,00 g/l
NaHCO ₃	2,00 g/l
Piruvato de Sódio	0,10 g/l
L-Alanina	0,20 g/l
L-Arginina	0,10 g/l
L-Glutamina.....	0,30 g/l
L- Metionina.....	0,07 g/l
L-Fenilalanina	0,08 g/l
L-Prolina	0,60 g/l
L-Serina.....	0,60 g/l
Taurina	0,18 g/l
L-Treonina	0,35 g/l
Adenosina	0,10 g/l
Guanosina	0,01 g/l
Glucosamina	0,05 g/l
MEM <i>amino acids solution</i> , 50X	10 ml
MEM <i>non essential amino acids</i> 100X.....	6 ml
Penicilina	0,059 g/l
Streptomicina.....	0,133 g/l
Ácido Fólico.....	0,004 g/l
PABA (ácido Para-aminobenzóico)	0,002 g/l
Biotina	0,002 g/l

3.4.5. Meio LB (Luria – Bertani)

Bacto-triptona	10 g/l
NaCl	5 g/l
Extrato de levedura	5 g/l

Para a preparação do meio sólido em placa de petri, foi utilizado o meio LB suplementado com de ágar 1,5%.

3.5. Metaciclogênese *in vitro*

O processo de diferenciação de formas epimastigotas para tripomastigotas metacíclicas de *T. cruzi* ocorre naturalmente no intestino do inseto vetor e pode ser mimetizado *in vitro* em condições quimicamente definidas permitindo isolar células em vários estágios dessa diferenciação deste parasita (CONTRERAS *et al.*, 1985; BONALDO *et al.*, 1988).

Para a obtenção das formas tripomastigotas metacíclicas, formas epimastigotas em final de fase exponencial de crescimento foram centrifugadas a 3.000xg por 5 minutos. As células foram suspensas em meio TAU com densidade de $5,0 \times 10^8$ células/ml e incubadas a 28 °C durante 2 horas. Após esse período de estresse nutricional, os parasitas foram inoculados na concentração final de $5,0 \times 10^6$ células/ml em meio TAU 3AAG e incubados a 28 °C sem agitação durante 96 horas. Durante este período, os parasitas aderiram nas paredes das garrafas de cultivo e se diferenciaram nas formas tripomastigotas metacíclicas, assim, soltando-se do substrato.

3.6. Eletroforese

3.6.1. Eletroforese de DNA

As amostras de DNA foram analisadas por eletroforese em gel horizontal de agarose conforme descrito em Sambrook & Russel (2001). As amostras foram diluídas em tampão de amostra para eletroforese de DNA (Tampão de amostra para eletroforese de DNA 6X – Azul de bromofenol 0,25%; Xileno cianol 0,25%; Glicerol 30%) e aplicadas em gel de agarose 0,8-2% (diluídas em tampão TBE 1X) submerso em tampão TBE (TBE 1X – Tris-base 89 mM; Ácido bórico 89 mM; EDTA 2 mM pH 8,0), juntamente com um marcador de peso molecular.

A corrida eletroforética foi realizada a 90 V e, em seguida, o DNA foi corado com solução de brometo de etídeo (brometo de etídio 0,5 µg/ml em água destilada) e visualizado em transluminador acoplado ao sistema de fotodocumentação.

3.6.2. Eletroforese em Gel de Poliacrilamida contendo SDS (SDS-PAGE)

As proteínas foram analisadas por gel vertical desnaturante SDS-PAGE, conforme o descrito por Laemmli (1970). Os volumes das soluções utilizadas para montagem dos géis de corrida e de empilhamento estão descritos na Tabela 1.

Para a obtenção de extratos proteicos total de *T. cruzi* e de *T. brucei*, os parasitas foram lavados com PBS adicionado de inibidores de protease e suspensos em tampão de amostra de proteínas [Tampão de amostra de proteína 4X (TA 4X) – Tris-HCl 0,16 M pH 6.8; SDS 4%; β-mercaptoetanol 10%; Glicerol 24%; Azul de bromofenol 0,02%], seguido de fervura a 100°C por 5 minutos, centrifugação a 14.000xg durante 2 minutos e coleta do sobrenadante para um novo tubo. Os extratos foram aliqüotados e estocados a -80°C até o momento de uso. A corrida eletroforética foi realizada em tampão de eletroforese para SDS-PAGE (Tampão SDS-PAGE 1X – Tris-base 25 mM; Glicina 0,192 M; SDS 0,1%) a 30 mA e, aproximadamente, 150 V.

Para as análises provenientes de imunoprecipitação (item 3.18), foi utilizado um sistema comercial de SDS-PAGE e as amostras foram preparadas conforme descrição do fabricante. Assim, foram diluídas em tampão de amostra NuPAGE® LDS Sample Buffer (Life technologies), com adição do agente redutor NuPAGE® Sample Reducing Agent (Life technologies) e utilização de géis de acrilamida de concentração gradiente NuPAGE® Novex® 4-12% Bis-Tris (Life technologies) submerso em tampão de corrida NuPAGE® MOPS SDS Running Buffer (Life technologies).

TABELA 1 – SOLUÇÕES DE PREPARO DE GEL SDS-PAGE

	Gel de empilhamento	Gel de Corrida		
	5%	10%	13%	15%
Acrilamida, estoque (33/0,9%)	0,7 ml	2,95 ml	3,8 ml	4,4 ml
Tris-HCl 2,5 M pH 8,8 (concentração final 400 mM)	-	1,6 ml	1,6 ml	1,6 ml
Tris-HCl 1 M pH 6,8 (concentração final 120 mM)	0,6 ml	-	-	-
H ₂ O ultra pura	3,7 ml	5,5 ml	4,6 ml	4,0 ml
SDS 10% (concentração final 0,1%)	50 µl	100 µl	100 µl	100 µl
Persulfato de amônio 10% (concentração final 0,075%)	35 µl	70 µl	70 µl	70 µl
TEMED (concentração final 0,07%)	7 µl	7 µl	7 µl	7 µl
Volume Final	5 ml	10 ml	10 ml	10 ml

3.6.2.1. Coloração por Azul de Coomassie

Os géis SDS-PAGE, após corrida eletroforética das amostras, foram corados em solução para coloração (Azul de Coomassie R-250 0,1%; Metanol 45%; Ácido Acético 10%) por aproximadamente 30 minutos à temperatura ambiente. A seguir, os géis foram incubados com solução de descoloração para SDS-PAGE (Metanol 30%, Ácido acético 10%, Água ultra pura 60%) para retirada do excesso do corante e visualização das proteínas.

Os géis comerciais foram corados utilizando o kit Staining with SimplyBlue™ SafeStain (Life technologies).

3.6.2.2. Coloração por Nitrato de Prata

Para coloração de maior sensibilidade em géis SDS-PAGE, alternativamente, foi utilizada a marcação por nitrato de prata. Para isso, o gel foi incubado em solução de fixação de SDS-PAGE (Etanol 50%; Ácido Acético 12%; Formaldeído 0,02%) por 30 minutos a temperatura ambiente e, em seguida, lavado 3 vezes com solução de Etanol 50%. Posteriormente, o gel foi incubado com solução de sensibilização para coloração por prata (Tiosulfato de Sódio 0,02% em água ultrapura) por 2 minutos, lavado com água ultrapura por três vezes e incubado com solução de coloração por prata (Nitrato de prata 0,2%; Formaldeído 0,03%) por 30 minutos. Após lavagem com água, a revelação foi realizada com solução de

revelação de prata (para 100 ml: Carbonato de Sódio 3%; Formaldeído 0,02%; 2 ml de solução de sensibilização). A reação foi interrompida com solução de término de revelação de prata (Etanol 50%; Ácido Acético 12%).

Alternativamente, os géis comerciais também foram corados utilizando o kit SilverQuest™ Silver Staining Kit (Life technologies).

3.7. Clonagem molecular de sequências nucleotídicas

3.7.1. Extração de DNA genômico

As extrações de DNA de *T. cruzi* Dm 28c e *T. brucei* 427 foram realizadas como descrito em Medina-Acosta & Cross (1993). Assim, o total de 1×10^{10} células cultivadas em meio LIT foi separado por centrifugação a 7.000xg por 10 minutos. As células foram lavadas em PBS, suspensas em 350 µL de tampão TELT (Solução contendo Tris-HCl 50 mM pH 8,0; EDTA 62,5 mM pH 9,0; LiCl 2,5 M; e Triton X-100 4%) e incubadas durante 5 minutos em temperatura ambiente. Após lise, o mesmo volume de fenol/clorofórmio foi adicionado e o material foi centrifugado a 13.000xg por 10 min. A fração aquosa foi coletada para um novo tubo e DNA foi precipitado com duas vezes o volume de etanol absoluto. O material foi centrifugado a 13.000xg por 10 minutos e o DNA foi lavado com etanol 70%, liofilizado e suspenso em tampão TE (Tris-HCl 10 mM pH 8,0; EDTA 1 mM pH 8,0).

3.7.2. Amplificação gênica por PCR

Oligonucleotídeos iniciadores foram previamente desenhados e sintetizados para a amplificação das sequências nucleotídicas pela reação em cadeia da polimerase (PCR). A finalidade de cada amplificação e as sequências de cada iniciador estão apresentadas na Tabela 2. O alvo de RNAi contra TbHel46 (Tb11.12.0011 / GI = 71756053) e o a sequencia dos *primers* foram definidos utilizando a ferramenta RNAi (REDMOND *et al.*, 2003) disponível no site do <http://trypanofan.path.cam.ac.uk/trypanofan/main/>.

Para as reações foram utilizadas Platinum® Taq DNA Polymerase High Fidelity (Invitrogen), DNA molde (DNA genômico de *T. cruzi*, *T. brucei* ou plasmídeo) e oligonucleotídeos iniciadores segundo o protocolo do fabricante da enzima. A

amplificação do cassete para o nocaute gênico de Hel45 foi realizado por uma *Taq* DNA polimerase recombinante produzido e fornecido pelo IBMP (Instituto de Biologia Molecular do Paraná).

As condições de amplificação referentes aos ciclos consistiram de 1 ciclo de desnaturação a 94 °C por 2 minutos, seguidos de 30 ciclos (desnaturação, anelamento do oligonucleotídeos iniciador e extensão), e um ciclo a 72 °C por 5 minutos. A temperatura de anelamento foi padronizada para cada conjunto de iniciador. Os produtos de amplificação foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 0,8-2%.

Os *amplicons* obtidos para clonagem na plataforma do sistema *Gateway* (Invitrogen) foram precipitados e purificados através de solução 30% PEG 8000/MgCl₂ 30 mM, conforme o recomendado pelo fabricante. Para os outros *amplicons*, foi utilizado o kit QIAquick Gel Extraction (Qiagen).

TABELA 2 - OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES DAS REAÇÕES DE AMPLIFICAÇÃO

Produto de amplificação	Oligonucleotídeos	Sequência nucleotídica	Uso
Hel45 (Tc00.1047053506587.40)	Hel45F	5´ GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATGGGAGACGTCGAGCAAATAG 3´	Amplificação do gene de Hel45
	Hel45R	5´ GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCCTAGAAGTGGTCCGCAATATTTGCA 3´	
Crml (Tc00.1047053511725.150)	CrmlF	5´ GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATGGAGTCCATTTTGGACACAAGT 3´	Amplificação do gene de Crml
	CrmlR	5´ GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCCTATTAAGAGAGGACGGACGGAAC 3´	
Neomicina	NeoF	5´ GGGGAAGCTTATGATTGAACAAGATGGATTGCACGCAG 3´	Confirmação do KO
	NeoR	5´ GGGGAATTCAGAAGAACTCGTCAAGAAGGCGATAGAA 3´	
Higromicina	HigroF	5´ GGGGAAGCTTATGAAAAAGCCTGAACTCACCGCGAC 3´	Confirmação do KO e clonagem para nocaute do 2º Alelo
	HigroR	5´ GGGTGAATTCTATTCCTTTGCCCTCGGACGAGTGCTG 3´	
Regiões intergênicas de flanqueadores do gene de Hel45	UPSF-KpnI	5´ CTACGGTACCGCACATGCATGCACGCATGCCTTCTTC 3´	Construção de cassete e confirmação do KO
	UPSR-Sall	5´ CCCTGTCGACTATTTTTCTCTGCCCTTCTTCCCTTCC 3´	
	DOWNF-EcoRI	5´ GAATTCTGAAACGCACGAAACGAAAAGAACCACCG 3´	
	DOWNR-XbaI	5´ TTCTAGATGTACCTGTGCGCCGTAAGGAAATGCC 3´	
	UPSextF	5´ CTCAAGGTTGAGTGCGGCGCAGT 3´	Confirmação do KO
	DOWNextR	5´ TCGCTGCATATCCCAAAGAAT 3´	
Fragmento alvo de RNAi contra TbHel46	RNAiF	5´ CGCTCTAGAGCCATTACATGGGCATCTCT 3´	Construção de vetor para RNA de interferência
	RNAiR	5´ CGCTCTAGATGCTCTACTTTCTTGCGGGT 3´	

Em negrito, está a sequência *attB* adicionada à extremidade 5´ do *primer*. Em sublinhado, estão demonstradas as sequências nucleotídicas de reconhecimentos para as enzimas de restrição.

3.7.3. Clonagem entre inserto e plasmídeo

Para a clonagem de Hel45 e Crm1 na plataforma *Gateway*, os oligonucleotídeos desenhados para a reação de PCR continham na extremidade 5' a sequência de reconhecimento *attB* (Tabela 2) para a reação posterior de recombinação com o sítio *attP* do vetor de entrada pDONRTM221 da plataforma *Gateway* (Invitrogen) (Figura 3.1).

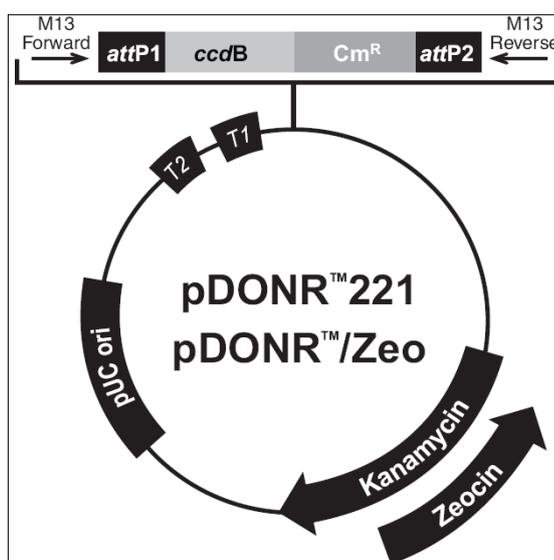


FIGURA 10 - MAPA GENÉTICO DO VETOR DE ENTRADA pDONRTM221 DA PLATAFORMA GATEWAY (INVITROGEN). *Kanamycin* = marca de resistência a Canamicina; *Zeocin* = marca de resistência a Zeomicina.

Com os insertos purificados, os amplicons de Hel45 e Crm1 obtidos anteriormente foram submetidos à primeira reação de recombinação com o vetor de entrada pDONRTM221 utilizando a enzima BP clonaseTMII (Invitrogen). Selecionados os plasmídeos recombinantes (conforme item 3.7.4.3), a segunda reação foi realizada para a recombinação com o vetor de destino pTcGWGFPN, que fusiona uma etiqueta GFP na extremidade N-terminal das proteínas (BATISTA *et al.*, 2010), através da ação da enzima LR clonaseTMII (Invitrogen). As reações foram realizadas de acordo com as recomendações do fabricante.

Para a construção dos cassetes de nocaute gênico (ver estratégia na Figura 2.3, Capítulo 2, Resultados), regiões intergênicas flanqueando o gene de Hel45 foram amplificadas com os primers UPSF/UPSR, para clonagem da intergênicas a

montante, ou DOWNF/DWNR, para a jusante, contendo os sítios de reconhecimento para as endonucleases de restrição específicas (Tabela 2) nas extremidades 5'. Os produtos amplificados, assim como o plasmídeo pKS/NEO1 (gentilmente cedido pelo Dr. Stenio Perdigão Fragoso), foram submetidos à digestão com as endonucleases de restrição, de acordo com as recomendações dos fabricantes. Os insertos preparados foram ligados ao vetor utilizando-se a relação molar 1:3 (plasmídeo:produto da PCR). A reação de ligação foi realizada por 16 horas a 16 °C utilizando a enzima T₄ DNA ligase (Invitrogen), também conforme especificações do fabricante. Foram realizadas duas etapas de clonagem: uma para inserção da região intergênica a montante (UPS) e outra, para a jusante (DOWN) do gene. O plasmídeo recombinante pKS/NEO-UPS-DOWN foi utilizada como molde para a amplificação do cassete NEO-UPS-DOWN por PCR com os *primers* UPSF e DOWNR e transfecção de *T. cruzi* para o nocaute do primeiro alelo do gene de Hel45. Para o nocaute do segundo alelo, foi realizada a substituição da marca de resistência para Higromicina da construção do vetor anterior. Assim, o gene de Higromicina foi amplificado com os iniciadores HigoF e HigoR, os amplicons e o vetor foram digeridos com as enzimas específicas (Tabela 2 e Figura 2.3) e ambos foram ligados. O plasmídeo recombinante foi usado como molde para amplificação do cassete HYGRO-UPS-DOWN.

Para a construção do vetor de RNAi (ver estratégia na Figura 2.8; Capítulo 2, Resultados), o fragmento alvo de TbHel46 foi amplificado com os oligonucleotídeos RNAiF e RNAiR e DNA genômico de *T. brucei*. O inserto e o plasmídeo p2T7-177 (WICKSTEAD *et al.*, 2002), continham sítios de reconhecimento para digestão com enzima XbaI (NEB). Assim, ambos foram submetidos à reação de digestão, segundo a recomendação do fabricante, purificados e ligados, utilizando também uma enzima T₄ DNA ligase (Invitrogen) em uma reação de ligação realizada por 16 horas a 16 °C, conforme especificações do fabricante.

3.7.4. Transformação e seleção de clones recombinantes

3.7.4.1. Preparo das células competentes

Para o preparo das células competentes, foi utilizado o método do cloreto de cálcio descrito em Sambrook & Russel (2001). Assim, uma colônia de bactéria *E. coli*

da linhagem DH5 α TM foi inoculada em 2 ml de meio LB contendo antibiótico apropriado. A cultura foi incubada a 37 °C por 18 horas sob agitação constante (200 rpm). Um volume de 1,0 ml (inóculo de 1:100) desta cultura foi transferido para 100 ml de meio LB. As células foram incubadas a 37 °C sob agitação constante até a fase de crescimento exponencial (DO₅₅₀ entre 0,4 e 0,6).

A cultura foi centrifugada a 4.000xg por 5 minutos a 4 °C, as células foram suspendidas em 50 ml (metade do volume da cultura original) de solução de preparo (CaCl₂ 100 mM, Hepes 10 mM pH 7,0) gelado e mantidas no gelo durante 30 minutos. A suspensão foi centrifugada nas mesmas condições anteriores e as células foram suspendidas em 2,0 ml (1/50 do volume original) de solução de estocagem (CaCl₂ 100 mM; Hepes 10 mM pH 7,0; Glicerol 10%). As células foram aliqüotadas e mantidas no gelo por pelo menos duas horas antes da transformação ou estocadas a -70 °C.

3.7.4.2. Transformação de *E. coli*

As reações de recombinação e de ligação dos insertos com os respectivos vetores foram incubadas no gelo por 30 minutos com 50-100 μ l de *E. coli* preparadas anteriormente (item 3.7.4.1). Após esse período, a mistura foi incubada a 42 °C durante 2 minutos e mais 2 minutos no gelo. Cerca de 1,0 ml de meio LB foi adicionado ao tubo e as células foram incubadas a 37 °C por uma hora, antes do plaqueamento. Diferentes diluições das bactérias transformadas foram inoculadas em placas de Petri contendo meio de cultura seletivo (meio LB; ágar 1,5%; Canamicina 30 μ g/ml para transformação da recombinação com pDONR ou Ampicilina 100 μ g/ml para pTcGWGFPN e p2T7-177) com auxílio de uma alça de Drigalski. As placas foram incubadas a 37 °C durante 18 horas.

3.7.4.3. Seleção de plasmídeos recombinantes

Para a seleção de clones das reações de recombinação, as colônias crescidas em meio seletivo foram coletadas e diluídas em 100 μ l de água ultrapura. Deste, 1 μ l foi utilizado como *template* para a reação de amplificação por PCR utilizando oligonucleotídeos iniciadores específicos (Tabela 2). Previamente, as amostras foram aquecidas a 94 °C durante 10 minutos e, posteriormente, foram

submetidas aos ciclos específicos de desnaturação, anelamento dos iniciadores e extensão de cada um dos fragmentos gênicos. As amostras foram analisadas em gel de agarose.

Para confirmar a clonagem dos plasmídeos recombinantes, as amostras foram enviadas para *Macrogen* Korea (Coréia do Sul, informações disponíveis em <http://www.macrogen.com/>) para sequenciamento. Foi utilizado o sequenciamento do tipo *single primer extention* e o protocolo estabelecido pela empresa.

3.7.5. Extração de DNA plasmidial

Para extração dos plasmídeos recombinantes foi utilizado o método da lise alcalina que é baseado na desnaturação seletiva, em pH alcalino, de DNA cromossômico de alto peso molecular. Após a neutralização do pH, o DNA cromossômico renatura formando um precipitado insolúvel com os restos celulares, enquanto o DNA plasmidial permanece em solução, podendo ser recuperado após precipitação com etanol.

As colônias selecionadas foram inoculadas em 2 ml de meio seletivo acrescido de antibiótico específico. As culturas foram incubadas a 37 °C durante 18 horas sob agitação constante e, em seguida, centrifugadas a 10.000xg durante 2 minutos. O sedimento foi suspenso em 100 µl de solução I (solução de suspensão: Glicose 50 mM, EDTA 10 mM, Tris-HCl 25 mM pH 8,0). Em seguida, foram adicionados 200 µl de solução II (solução de lise: SDS 1%, NaOH 0,2 N) e homogeneizado por inversão. Posteriormente, foram adicionados 200 µl de solução III [solução de neutralização: Acetato de potássio pH 4,8 (3M de potássio), Ácido acético (5M de acetato na soma final de acetato)] e também homogeneizado por inversão. A seguir, a mistura foi centrifugada 15 minutos a 10.000xg e o DNA plasmidial contido no sobrenadante foi precipitado com 500 µl de isopropanol. O material foi centrifugado 10 minutos a 10.000xg e submetido à lavagem com 1,0 ml de etanol 70% gelado. Após novamente centrifugado a 13.000xg por 10 minutos, o sedimento foi secado e suspenso em 30 µl de água deionizada estéril ou tampão TE (Tris-HCl 10 mM pH 8,0; EDTA 1 mM pH 8,0).

Para ensaios utilizando o clone positivo nas reações de recombinação, os plasmídeos recombinantes foram extraídos e purificados utilizando o kit *QIAprep Spin Miniprep* (Qiagen) e, nos processos de transfecção em *T. cruzi*, foi utilizado o

kit de extração *Qiagen Plasmid Midi Kit* (Qiagen). Ambas as purificações foram realizadas conforme descrição em protocolo padrão do fabricante.

3.8. Transfecção de tripanossomatídeos

Para a transfecção do cassete foram purificados 10 µg de cada fragmento gênico e para, os plasmídeos, o equivalente a 50 µg foi utilizado. Assim, para cada transfecção, formas epimastigotas em fase logarítmica de crescimento foram coletadas por centrifugação por 5 minutos a 3.000xg. Após lavagem com PBS estéril, 4×10^7 células foram suspensas em 0,4 ml de tampão de eletroporação de *T. cruzi* (NaCl 140 mM, HEPES ácido 25 mM, Na₂HPO₄ 0,74 mM) e transferidas para cubeta de eletroporação de 0,2 mm pré-resfriada. Em seguida, o DNA foi adicionado às células e a mistura foi incubada por 10 minutos no gelo. A mistura foi submetida à eletroporação com dois pulsos de 450 V e 500 µF utilizando eletroporador GenePulser® II Apparatus (Bio-Rad). Em seguida, as células foram transferidas para garrafas de cultura de 25 cm² contendo 10 ml de meio LIT e incubadas a 28 °C. A seleção dos parasitas foi feita através da incubação em meio contendo G418 (análogo a Neomicina) e para controle da seleção formas epimastigotas foram eletroporadas sem a presença de DNA. Após o período de recuperação de 24 horas, foi acrescentado G418 na concentração final de 500 µg/ml na cultura. As culturas foram cultivadas com passagens regulares até a observação do não crescimento das células da cultura controle (sem adição de DNA). As linhagens selecionadas e estáveis foram mantidas com G418 a 250 µg/ml no meio de cultura.

Para cada transfecção de *T. brucei* 29-13 (WIRTZ *et al.*, 1999), previamente o vetor recombinante foi digerido com a enzima NotI (Invitrogen) para ser linearizado, conforme recomendação do fabricante. Essa linearização é necessária para a integração do vetor em regiões repetitivas de repetições 177 de minicromossomos dentro do genoma do parasita (WICKSTEAD *et al.*, 2002). Desse modo, o equivalente a 1×10^8 parasitas em fase logarítmica de crescimento foi centrifugado a 5.000xg por 3 minutos, lavados com 2 ml de tampão de eletroporação ZPMF (129 mM NaCl, 1,5 mM KH₂PO₄, 8 mM KCl, 8 mM NaH₂PO₄, 1,5 mM MgCl₂, 90 µM CaCl₂, 2,4 mM CH₃COONa pH 7,0), centrifugados novamente nas mesmas condições e suspensos em 450 µL de ZPMF. Os parasitas foram transferidos para a cubeta de eletroporação de 0,4 mm e a quantidade de 15 µg de plasmídeo

previamente linearizado foi adicionado. A suspensão celular foi incubada por 10 minutos no gelo, submetida a um pulso de 1,5 kV com 40 capacitância de 25 μ F em eletroporador GenePulser II Apparatus (Bio-Rad) e, rapidamente, transferida pra 10 mL de meio SDM-79 suplementado com 10% SBF e antibióticos, conforme descrito no ítem 3.3.2.

Em uma placa de petri, foi misturado 5,5 mL dos parasitas submetidos à transfecção, 5,5 mL dos parasitas não transfectados e 15,5 mL do meio SDM-79 suplementado. Desta mistura, o volume de 250 μ L foi transferido para cada poço de uma placa de poliestireno de 96 poços. Os parasitas foram incubados em estufa de CO₂ 5% a 28°C por 24 horas. Após este período, foi realizado o repique na proporção de 1:4 em outra placa de poliestireno de 96 poços, contendo a mesma concentração de antibiótico. Os parasitas foram mantidos na estufa de CO₂ durante aproximadamente 10 dias ou até a turbidez do meio, indicando a seleção e o crescimento dos parasitas. A população foi expandida para ensaios posteriores.

3.9. Silenciamento gênico por RNA de interferência

Depois de obtida a linhagem celular estável, os parasitas foram submetidos ao silenciamento de Hel45 por RNAi. Assim, os parasitas na densidade celular de 5×10^5 células/ml foram induzido com a adição no meio de cultura de 2 μ g/mL de tetraciclina na concentração de tetraciclina. Para garantir o efeito do silenciamento, 1 μ g/mL de tetraciclina foi adicionado a cada 24 horas, para ensaios acima desse tempo. Como controle, foi utilizada a mesma linhagem transfectante mantida sob as mesmas condições anteriores, porém sem a adição de tetraciclina.

3.10. Eletroforese em campo pulsado seguido de *Southern blot*

Uma das abordagens para confirmar o nocaute foi através de gel de eletroforese em campo pulsado (PFGE - *pulsed-field gel electrophoresis*) seguido de *Southern blot*. Assim, foi realizado o emblocamento de parasitas selvagem (WT), utilizado como controle, e da linhagem nocaute (KO) pra Hel45, contendo cada um o equivalente a 2×10^7 parasitas. As células foram centrifugadas por 15 minutos a 5.000xg e lavadas 2 vezes com tampão NKM pH 8,0. Após as lavagens, foram

suspensas em 600 µl de solução PSG (Fosfato de sódio 75 mM pH 8,0; NaCl 65 mM, Glicose 1,5%), misturado com igual volume de solução PSA 1% aquecido (Fosfato de sódio 75 mM pH 8,0; NaCl 65 mM; Agarose *Low Melting* 1%) a 37°C e a suspensão foi imediatamente aplicada nos poços de um molde específico para a solidificação da agarose. Esses blocos com os parasitas foram incubados em solução de lise (EDTA 0,5 M pH 9,0; Sarcosyl 1%, Proteinase K 0,5 mg/ml) a 50°C durante de 48 horas e estocados nesta solução a 4°C até o uso. Os blocos utilizados para a análise foram lavados três vezes com de EDTA pH 8,0 50 mM por uma hora antes de ser aplicado no gel de eletroforese.

Para a preparação do gel de eletroforese, foi utilizado gel de agarose 1,2% em tampão TBE 0,5X. Os blocos foram aplicados no gel e selados com agarose 1%. O tampão de corrida TBE 0,5X foi previamente resfriado a 4 °C e a eletroforese seguiu um programa com cinco fases de tempos crescentes de pulsos (N/S, E/W) por 135h a 83 V - *interpolation*. Fase 1 teve pulso de 90 s (30 h); fase 2, 200 s (30 h); fase 3, 350 s (25 h); fase 4, 500 s (25 h) e fase 5, 800 s (25 h). Após a corrida eletroforética, o DNA cromossomal foi transferido pelo método de *Southern blot*. O tratamento do gel contendo as amostras consistiu de incubações consecutivas das seguintes soluções: HCl 0,25 M por 15 minutos, solução de neutralização de NaOH 0,5 M e NaCl 1,5 M por 30 minutos com 2 repetições e solução de Tris-HCl 0,5 M pH 7,5 e NaCl 1,5 M por 30 minutos. A transferência do DNA para a membrana de náilon (Hybond - Amershan) foi realizada durante 16 horas por capilaridade utilizando tampão SSC 20X. Após a transferência, o DNA foi fixado à membrana com luz ultravioleta (302 nm) com uma dose de 120 mJ/cm² pelo o aparelho Spectro Linker XL1500 UV Crosslinker (Spectronics corp., USA) e, em seguida, foi realizada pré-hibridação por 1 hora a 65°C com solução de hibridação (Solução de hibridação de DNA - SSC 6 X, solução de Denhardt 5 X, SDS 0,1 % e DNA de esperma de salmão fita simples 100 µg/ml). As sondas para a hibridação referente ao gene de Hel45, genes de resistência a Neomicina e Higromicina foram amplificadas por PCR e marcadas radioativamente pela técnica de *nick translation* - *Nick Translation System* (Invitrogen). Estas reações continham 100 ng de DNA, 2,5 U DNA Polimerase I, 2 mU DNase I, dNTPs (exceto dCTP) 0,1 mM cada, α-[P³²]-dCTP (10 µCi/µl; 3,000 Ci/mmol) e H₂O para completar 50 µl. Em seguida, as reações foram incubada a 16 °C por 1 hora em banho seco e purificadas em colunas de resina G-50 (Invitrogen), centrifugando por 2 minutos a 2.000xg. A seguir, as amostras foram desnaturadas com incubação a 100°C por 5 minutos e, imediatamente, resfriadas

em gelo por 5 minutos. A hibridação com as sondas foi realizada durante 16 horas nas mesmas condições da pré-hibridação. Após a hibridação, as membranas foram lavadas 6 vezes por 15 minutos na mesma temperatura de hibridação com SSC 2X e SDS 0,1%, decrescendo a concentração de SSC a cada 2 lavagens (2x, 1x, 0,1x). A exposição foi feita em filme Amersham Hyperfilm (GE) durante 24 horas a -80°C.

3.11. Ensaios do tipo *Western blot*

As proteínas foram separadas em gel de eletroforese SDS-PAGE e transferidas para uma membrana de nitrocelulose (Hybond C, Amersham Biosciences) em Tampão de transferência para *Western blot* (Tris-base 25 mM, Glicina 192 mM, Metanol 20%). A membrana foi bloqueada com tampão de bloqueio (Tampão PBS 1X; Tween 20 0,1%; Leite em pó desnatado 5%) e os anticorpos primários policlonais, incubados por 1 hora, foram diluídos no mesmo tampão nas seguintes concentrações: anti-Hel45 (1:500, produzido em camundongo em projetos anteriores), anti-GAPDH (1:500, produzido em camundongo e fornecido gentilmente por Ma Flávia S. Pereira de Souza), anti-Actina (1:100, produzido em camundongo e fornecido gentilmente por Ligia Cristina Kalb Souza), anti-Sub2 (1:1.000, produzido em coelho e pelo nosso grupo em outros projetos), anti-L26 (1:500, produzido em camundongo e fornecido gentilmente por Ma Flávia S. Pereira de Souza), anti-S7 (1:1000, produzido em camundongo e pelo nosso grupo em outros projetos), anti-Nup95 (1:500, produzido em camundongo e pelo nosso grupo em outros projetos). A membrana foi então lavada três vezes com PBS contendo Tween 20 0,1%.

3.11.1. Revelação por Fosfatase Alcalina

Nesse ensaio foi utilizada a marcação do anticorpo secundário conjugado à fosfatase alcalina. A membrana foi lavada três vezes por 5 minutos com solução PBS contendo Tween 20 0,1%. A membrana foi, então, incubada por 1 hora a 37 °C sob agitação com anticorpos anti-IgG de coelho ou de camundongo conjugados com a enzima fosfatase alcalina (Promega) na diluição de 1:10.000 em PBS/Tween 20 0,1%. A membrana foi novamente lavada como descrito anteriormente. A reação imunoenzimática foi revelada com os substratos NBT a 50 mg/ml (Promega) e BCIP

a 50 mg/ml (Promega) em tampão da fosfatase alcalina (Tris-HCl 100 mM pH 9,5; NaCl 100 mM; MgCl₂ 5 mM). Após a revelação, esta reação foi interrompida por solução de EDTA 100 mM.

3.11.2. Revelação por Quimioluminescência (Peroxidase)

Para aumentar a sensibilidade de revelação, alternativamente foi utilizado um método quimioluminescente. Do mesmo modo anterior, a membrana de nitrocelulose incubada previamente com o anticorpo primário, foi lavada com solução PBS/Tween20 0,1%, seguido de incubação com o anticorpo secundário, anti-IgG de coelho ou camundongo conjugado à peroxidase (Amersham Biosciences) na diluição de 1:10.000 por 1 hora a 37 °C. O produto da reação enzimática foi detectado por quimioluminescência, através do kit ECL *Western blotting* (Amersham Biosciences) seguindo as instruções do fabricante. A exposição foi feita em filme (Kodak) durante tempo variável para cada anticorpo.

A quantificação da intensidade das bandas por densitometria foi obtida pelo programa ImageJ (disponível no site imagej.nih.gov/ij/).

3.12. Microscopia óptica

3.12.1. Localização de proteínas

A localização das proteínas fusionada a GFP em formas epimastigotas das populações transfectadas foram visualizadas diretamente em microscopia ótica de fluorescência. As lâminas foram preparadas com poli-L-lisina e os parasitas foram centrifugados a 2.000xg, lavadas duas vezes e suspensas em PBS. Posteriormente, foram fixadas em para-formaldeído 4% e aderidas por 20 minutos nas lâminas previamente preparadas e, em seguida, as lâminas foram lavadas com PBS. Para a coloração nuclear e do cinetoplasto foi acrescentado DAPI (5 mg/ml) em temperatura ambiente por 5 minutos, seguido de lavagens com PBS. Foi então adicionado N-propil-galato e as lâminas foram lacradas utilizando lamínula de microscopia e selador. As lâminas foram observadas em microscópio de fluorescência Nikon E600 com sistema de câmera CoolSnap PROcf (Media Cybernetics) e análise com Image Pro-Plus v. 4.5.1.22 (Media Cybernetics).

3.12.2. Localização de mRNAs através da técnica de hibridização *in situ* fluorescente (FISH)

Para a detecção de RNA poli(A)⁺ em *T. brucei* e *T. cruzi*, os parasitas foram coletados, lavados em PBS (pH 7,4), fixado por incubação em paraformaldeído a 4% e foram aderidos em lâminas a revestidas com poli-L-lisina. As lâminas foram lavadas com PBS e os parasitas foram permeabilizadas por incubação com HCl 0,2 M (diluído em PBS) durante 10 minutos. As etapas seguintes de pré-tratamento do parasita e hibridização foram realizadas sob condições livres de RNase. Para *T. cruzi*, as células foram incubadas com tampão de pré-hibridação [baseado em Zeiner *et al.* (2003) (formamida 35%, BSA 0,02% em tampão SSC 2X)] suplementado com 25 µg/ml de tRNA, DNA de esperma de salmão de 1 mg/ml (Sigma-Aldrich) e 40 U/ml RNaseOUT (Invitrogen) durante 30 minutos a 37°C. Para *T. brucei*, as células foram incubadas com o tampão de pré-hibridação [baseado em Schwede *et al.* (2009) contendo a solução de Denhardt10X, EDTA 1 mM, formamida 35% em 4X SSC] e suplementado com 0,5 µg/ml de tRNA e 2 mU/ml RNaseOUT durante 30 minutos à temperatura ambiente. A sonda de oligo(dT) conjugada à digoxigenina (6 ng/µl) foi diluída no devido tampão de pré-hibridação para cada parasita e desnaturada por aquecimento a 65°C durante 3 minutos. A hibridização foi realizada durante 16 horas a 37°C. Como controle, 100 µg/ml de RNase A foi adicionado ao tampão antes da hibridação da sonda. Em seguida, as células foram lavadas com SSC 2X por duas vezes e a detecção da sonda no parasita foi realizada por imunofluorescência indireta com anticorpo monoclonal de anti-digoxigenina (Sigma-Aldrich, diluição 1:300 produzido em camundongo) e anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado a Alexa Fluor 488 (Invitrogen, diluição 1: 600 produzido em cabra). A coloração de DNA e análise de microscopia foi realizada conforme item anterior.

3.12.3. Coloração pelo método de panótico rápido

A morfologia do parasita foi observada com coloração pelo método de panótico rápido (Laborclin, Pinhais, PR, Brazil). Assim, parasitas da forma epimastigotas selvagem e nocaute de Hel45 foram coletadas por centrifugação a 3.000xg por 2 minutos e suspensas em PBS. As células foram depositadas e

espalhadas sobre as lâminas e deixadas para secar a temperatura ambiente. Após isso, as lâminas foram submersas, nas soluções do kit: Solução 1 (Fixador), Solução 2 (Revelador) e na Solução 3 (Corante) por 15 segundos cada. Em seguida, as lâminas foram lavadas em água, secas à temperatura ambiente e cobertas com Permault e lamínula. Os parasitas foram visualizados em microscópio óptico Nikon E600.

3.13. Microscopia ultraestrutural

Os parasitas na forma epimastigotas em fase de crescimento exponencial foram coletados, lavados com PBS e fixados em solução contendo 2,5% de glutaraldeído, 4% de paraformaldeído em tampão Cacodilato 0,1 M pH 7,2. Em seguida, os parasitas foram fixados em solução de 1% de tetróxido de Ósmio e 0,8% de ferricianeto de potássio diluídos em tampão Cacodilato 0,1 M durante 1 hora. Após lavagem nesse tampão, os parasitas foram desidratados a -20°C em concentrações crescentes de etanol (30%, 50%, 70%, 90% e 2X em 100%) a 4 °C, por 1 hora em cada etapa. Em seguida, o material foi infiltrado em resina Epon EMBED 812 (EMS, Hatfield, PA, USA) a -20°C, nas condições: etanol 100%:resina (2:1) por 16 horas; etanol 100%:resina (1:1) por 8 horas e etanol 100%: resina (1:2) por 16 horas. Posteriormente, o material foi incluído em resina pura a -20 °C e a polimerização da resina foi realizada a -20°C por 72 horas, sob luz UV. Cortes ultrafinos foram obtidos com um ultramicrótomo Leica Reichert Ultracuts, contrastados em acetato de uranila e citrato de chumbo e observadas em microscópio de transmissão Zeiss EM-900.

3.14. Avaliação do nível de tradução por marcação metabólica

Formas epimastigotas de *T. cruzi* em fase de crescimento exponencial foram coletadas por centrifugação e lavadas em tampão NKM. As células foram suspensas em meio TAU3AAG suplementado com metionina [S^{35}] [Concentração = 31,5 μ Ci/ml / Atividade específica > 600 Ci (22,2 TBq)/mmol (Perkin Elmer)] e incubadas durante 1 hora a 28°C. Como um controle, os parasitas foram tratados com 100 μ g/ml de cicloheximida durante 20 minutos antes da incubação com metionina. Alíquotas de

10 µl foram depositadas em papel filtro 3MM e as proteínas foram precipitadas com Ácido tricloroacético 10% (TCA). Após lavagens, em TCA 5%, Acetona 100% e Etanol 100%, a marcação radioativa foi quantificada em analisador de cintilação líquida Packard, modelo Tri-carb 1600TR.

3.15. Sedimentação de polissomos através de gradiente de sacarose

A análise do perfil polissomal foi realizada conforme descrito por Gradia *et al.* (2009). Assim, o extrato citoplasmático de 1×10^9 formas epimastigotas de *T. cruzi* (cultivadas em crescimento exponencial) foi obtido após o tratamento com 100 µg/ml de cicloheximida por 10 minutos a 28 °C. As células foram centrifugadas a 5.000xg por 5 minutos a 4 °C e lavadas duas vezes com tampão TKMC (Tris-HCl 10 mM pH 7,4; MgCl₂ 10 mM; KCl 300 mM) gelado adicionado de cicloheximida 100 µg/ml. Após descartar o sobrenadante, as células foram suspendidas em 900 µl de tampão TKM suplementado com 100 µg/ml de cicloheximida, 10 µg/ml de heparina, 10 µM de E-64 e 10 mM de PMSF. A suspensão foi transferida para um novo tubo contendo 100 µl de tampão de lise (tampão TKM suplementado com 10% (v/v) de NP-40 e Sacarose 2 M) e homogeneizado no vórtex rapidamente. O lisado foi então centrifugado a 16.000xg a 4 °C por 5 minutos e o sobrenadante foi adicionado sobre o gradiente de sacarose linear (15-55%), preparado em tampão TKM acrescido de inibidores 1 mM PMSF e 10 µM E-64.

Para ensaios com puromicina, 1×10^9 formas epimastigotas de *T. cruzi* foram tratadas com 2 mM da droga por 1 hora a 28 °C. Os parasitas foram centrifugados a 6000xg durante cinco minutos e suspendidos em 900 µl of tampão TKMP (Tris-HCl 10 mM pH 7,4; MgCl₂ 2 mM; KCl 500 mM, puromicina 1 mM) suplementado com 10 µg/ml de heparina, 10 µM de E-64 e 1 mM de PMSF. As células foram lisadas com a adição de 100 µl tampão TMKP suplementado com NP-40 10% e 2 M sacarose. O lisado foi centrifugado e o sobrenadante foi adicionado ao topo do gradiente de sacarose (15–55%) preparado com tampão TKMP e adicionado de inibidores 1 mM PMSF e 10 µM E-64. Todos os gradientes foram centrifugados a 192.000xg por 2 horas a 4 °C em ultracentrífuga Hitachi Himac CP80WX em rotor P40ST.

Após centrifugação, o equivalente a 500 µl foi coletado de cada fração utilizando o sistema de separação de gradiente (ISCO) e detector UA-6 UV/VIS com leitura a 254 nm. Este equipamento é destinado à coleta e quantificação de frações

de gradientes de densidade e fornece um perfil de absorvância contínuo (filtro 256 nm) à medida que as frações são coletadas. O fracionamento foi obtido com a introdução de uma solução de sacarose 65% que foi injetada perfurando-se a base do tubo que contém o gradiente previamente centrifugado.

3.16. Quantificação do nível de mRNA por PCR quantitativo

PCR quantitativo foi realizado de acordo com critérios MIQE (BUSTIN *et al.*, 2009). O RNA total foi extraído de epimastigotas de *T. cruzi* na fase de crescimento exponencial com o kit RNeasy® Mini Kit (Qiagen), utilizado de acordo com as instruções do fabricante. O DNA remanescente na amostra foi digerido com 1 U de DNase RQ1 (Promega) por µg de RNA. A reação de transcrição reversa realizada com 1 µg de RNA, *primer* oligo(dT) (Invitrogen) e o kit ImProm-II™ Reverse Transcription System (Promega), conforme protocolo do fabricante. O cDNA obtido foi utilizado para as reações de PCR quantitativo realizadas em termociclador AB7500 (Applied Biosystems). Assim, as reações foram realizadas contendo 10 ou 20 ng de cDNA, 5 pmol de cada oligonucleotídeo específico para cada gene (Tabela 3) e 10 µl Fast SYBR® Green Master Mix (Applied Biosystem), em um volume final de 20 µl. Para determinação de um valor arbitrário das amostras, foi construída uma curva padrão com cinco pontos (em triplicata técnica) a partir de 40 ng total de uma amostra com concentração determinada, usando diluição seriada com razão 1:5.

A reação foi incubada a 95 °C por 10 minutos, seguida de 45 ciclos de 95 °C por 15 segundos, temperatura de anelamento de acordo com a padronização dos oligonucleotídeos por 30 segundos e extensão a 72 °C por 1 minuto. A emissão da fluorescência foi quantificada nas etapas de extensão. Após a ciclagem, foi adicionada a etapa de dissociação. Cada amostra e o normalizador foram analisados em triplicata e o resultado das médias e dos desvios padrão foi utilizado para analisar a expressão gênica. Os níveis de expressão foram calculados pelo método de Livak & Schmittgen, 2001.

TABELA 3 - OLIGONUCLEOTÍDEOS UTILIZADOS NAS ANÁLISES DE qPCR

Produto de amplificação	Oligonucleotídeos	Sequencia 5'→3'
hypothetical protein, conserved (Tc00.1047053509455.114)	HIP 114F1	TGGCTCATGTCATTAACCTTTCAA
	HIP 114R1	GTGAAGGGCAGTGTAAAGTCGT
	HIP 114F2	CATGGGTTTGGGTTGGGATTT
	HIP 114R2	ACTTCGCTTGGGTGCTCA
U2 splicing auxiliary factor, putative (Tc00.1047053503577.20)	U2 77.20F1	GGAGAAACATAGCCGAGGAAGT
	U2 77.20R1	AATCACTTGGATGCGGTCTTG
	U2 77.20F2	CGGACGCGTCTCACATT
	U2 77.20R2	TGCCCCGCGTCCACACTT
ribosomal protein L37, putative (Tc00.1047053506885.14)	L37F1	CCGCCGCCGTTACAAT
	L37R1	TGCGGTTACCTCCTTCAG
	L37F2	GCGGCCGCAACGCATACC
	L37R2	CAGTGCACGGCGTTTGATG
mitochondrial processing peptidase alpha subunit, putative,metallo-peptidase, Clan ME, Family M16, putative (Tc00.1047053511367.340)	MIT 67.340F1	GTGCAGTCATTCTACCGTCCATA
	MIT 67.340R1	CAACTTCGTCGTCCTTCACTTT
	MIT 67.340F2	AAAGTGAAGGACGACGAAGTTG
	MIT 67.340R2	TAAAGTGGAATAAAGTCGCAG
hypothetical protein, conserved (Tc00.1047053511727.100)	HIP 27.100F1	GCACAGATGCAGGGGAAGTTT
	HIP 27.100R1	TACGGTTGCTTCTTCAGGCTTATT
	HIP 27.100F2	TAAAGAGACTTTATCCCTGACACA
	HIP 27.100R2	GCACCACCCGCTACCAT
cyclophilin, putative (Tc00.1047053506413.80)	CYCLO37.110F1	CGTTGTCTTTGGACAGGTGCTA
	CYCLO37.110R1	ATGCCTCCTTTAGAACACCACA
	CYCLO37.110F2	ATTATCCCGGCTTTATGATTC
	CYCLO37.110R2	GAGAGTATCCCTGGCCCTTTAT
vacuolar-type proton translocating pyrophosphatase 1 (Tc00.1047053510773.20)	VAC73.20F1	CTTGATGCCGAGGTAACACTA
	VAC73.20R1	CGAGAAGCAGTACGGCAACAT
	VAC73.20F2	GCGGACTGCATAGGCGATAA
	VAC73.20R2	CCGGCGGCAATCACAAAG
protein tyrosine phosphatase-like protein, putative (Tc00.1047053509109.130)	TYRO 09.130F1	CACTTGATGCGGTGGGTTACG
	TYRO 09.130R1	GCAGATCAAAGACCCTCATTACC
	TYRO 09.130F2	CTCGAACAGGAGAACAACAGTCA
	TYRO 09.130R2	GCCAGCGCAACCAAAATG
ATP-dependent DEAD/H RNA helicase, putative (Tc00.1047053510187.290)	DEAD87.290F1	GCAAAGGCCGCGCTATCAG
	DEAD87.290R1	TTGCCGGCAGTTCATTATTATTC
	DEAD87.290F2	CTCGATATAAAGAGCTGGAGACTGT
	DEAD87.290R2	GTGTGAACGCCTCTCCTTTTG
membrane-bound acid phosphatase, putative (Tc00.1047053506025.4)	MBOUNDF1	CGTGTCCACCCGTTCCATT
	MBOUNDR1	CGCTCTCACTGGCGTAAATCC
	MBOUNDF2	CACGTCTCGCAGGGCTACAAC
	MBOUNDR2	CGTACTGCATCATCTTCTCGTGT
hexose transporter (pseudogene), putative,hexose transporter, putative, frameshift (Tc00.1047053506355.100)	HEXO55.100F1	GTGAGGAGTCCGCTTCTTTT
	HEXO55.100R1	TCCTCCACGGGTACAAGAAGAAC
	HEXO55.100F2	AACTGTTCCACGCTCTTTCCG
	HEXO55.100R2	AGATAAGACCAATGCAGCCAAAAA
NADH-dependent fumarate reductase, putative (Tc00.1047053503849.60)	NADH49.60F1	GCCGGAGAAGGATACAACCATT
	NADH49.60R1	GCAGCAACCTCGTCCACATAGT
	NADH49.60F2	TTTACCTGACGATGAGGGTGTGT
	NADH49.60R2	GCAGCTTTCATTTCCACCGTATC
actin, putative (Tc00.1047053510571.30)	ActinaF	ACAATCATGCAGGTGGGTAAC
	ActinaR	ATTTGTTGATGGACTGGAAGGT
ribosomal protein S7 (Tc00.1047053506593.19)	S7F	CGTGATCGCAAACGCGTGGAGTC
	S7R	TTCCACATGAAGCCAAAACCTC
RNA helicase Sub2 (Tc00.1047053508319.40)	Sub2F	GAGAAGGAGATTAACGTGAGAAC
	Sub2R	TCTGGTTAAGTTGAGTGCTGATG
60S ribosomal protein L26, putative (Tc00.1047053511067.20)	L26F	CTTTCAGGCGCCGAGTCAT
	L26R	CGCGCACTTCATCGTCTTA
RNA helicase Dhh1 (Tc00.1047053506959.30)	DHH1F	TGGCCGCTCCGGTCCGCTTT
	DHH1R	TTATGCGGCGTAGAGTTCAGG
Beta tubulin (Tc00.1047053506563.40)	BtubF	GGCGCAGAGCTGATTGATT
	BtubR	GTACCACCGCCAAGAGAGTG
zinc finger protein 2, putative (Tc00.1047053401469.10)	ZFP2F	AGATGTGCATCTATTGGGAAAAA
	ZFP2R	TCTTCCGATGGCTGTTGAG

3.17. Quantificação do nível de proteína por abordagem proteômica

O equivalente a 5×10^7 parasitas selvagem (WT) e nocaute de Hel45 (KO) em fase de crescimento exponencial foram obtidas por centrifugação a $5000 \times g$ durante 5 minutos. Essas células foram lavadas em PBS e o extrato proteico total foi obtido baseado na metodologia de FASP (FASP – *Filter-Aided Sample Preparation*) (WIŚNIEWSKI *et al.*, 2009). Assim, a lise das células foi realizada em tampão contendo Ureia 7M, SDS 4%, DTT 1 mM, $MgCl_2$ 1mM e um coquetel de inibidor de proteases (COMPLETE Mini Protease inhibitor cocktail tablet, Roche) e os restos celulares não solubilizados foram removidos por centrifugação $15.000 \times g$ por 15 minutos. O sobrenadante foi incubado com nuclease benzonase 1 mM durante 30 minutos. A concentração das amostras foi determinada, e a quantidade de 15 μg de extrato de proteína foi separada para um filtro *Microcon*[®] 10K devices (Milipore), onde foram realizadas as etapas de alquilação com iodoacetamida 5,5 mM por 20 minutos (no escuro), adição de 4 volumes de Bicarbonado de amônio 20 mM e digestão com tripsina (Promega) na razão de 1/50 (protease/proteína) durante 16 horas. Peptídeos tripticos foram removidos do filtro por centrifugação e purificados usando colunas RP-C18 (em *Stage tip*). As misturas de peptídeos foram separadas *online* por cromatografia líquida (nanoLC - *nanoscale capillary liquid chromatography*) de fase reversa (RP) e analisadas no espectrômetro de massas por *electrospray* (ESI MS/MS - *electrospray tandem mass spectrometry*). Os experimentos foram realizados nos aparelhos com sistema 1D nanoLC plus (Eksigent, Dublin, CA) conectados ao espectrômetro de massas LTQ Orbitrap XL ETD (plataforma de espectrometria de massas RPT02H PDTIS / Instituto Carlos Chagas - Fiocruz Paraná) equipado com uma fonte de íons *nanoelectrospray* (Thermo Scientific). A separação cromatográfica dos peptídeos aconteceu em uma coluna de 15 centímetros de sílica (75 mm de diâmetro interno) a nível interno empacotada com resina de fase inversa C18 ReproSil-Pur-AQ de 3 μm (Dr. Maisch GmbH, Ammerbuch-Entringen, Alemanha). Assim, as misturas de peptídeos foram injetadas para a coluna com fluxo de 250 nL/min e, em seguida, eluída com concentrações gradiente de 5% a 40% de acetonitrila em ácido fórmico durante 180 minutos. O espectrômetro de massas foi operado em modo dependente de dados para alternar automaticamente na aquisição de MS e MS/MS (MS²). Os espectros de MS para cada amostra foram analisada com 5 intervalos diferentes de massa (300-520 m/z, 495-625 m/z, 600-720 m/z, 695-875 m/z e 850-1400 m/z) e os dados foram adquiridos no analisador Orbitrap com resolução de $R = 60.000$ em m/z 400

(após a acumulação de um valor-alvo de 1.000.000 no *ion trap linear*). Os dez íons mais intensos foram sequencialmente isoladas e fragmentadas no *ion trap linear* usando dissociação induzida por colisão com um valor-alvo de 10.000. Ions alvos selecionados para MS/MS foram excluídos dinamicamente durante 90s. A opção de "lock mass" foi ativado em todas as análises completas para melhorar a precisão de massa de íons precursores (OLSEN *et al.*, 2005).

3.18. Imunoprecipitação

Esta etapa foi realizada em colaboração com o Dr Mark C. Field da Universidade de Dundee. Assim, *nanobody* anti-GFP recombinante derivado de domínios VHH de camélídeos, expressado e purificado previamente conforme descrito em Fridy *et al.* (2014), foi cedido pelo grupo do Dr. Michael P. Rout.

3.18.1. Acoplamento de *nanobody* anti-GFP a esferas magnéticas

Inicialmente, foram utilizados 30 mg de esferas magnéticas Dynabeads® M-270 epoxy (Life technologies) que foram lavados com 1 ml de tampão fosfato pH 7,4 100mM e suspensas em 100 µl do mesmo tampão fosfato. Bactérias *Escherichia coli* linhagem Arctic Express (DE3) (Agilent) transformadas com o vetor pET21-peIB-VHH foram utilizadas para a indução, expressão e purificação de *nanobody* recombinante α-GFP, conforme descrito em Fridy *et al.* (2014). 100 µl de *nanobodies* (contendo o equivalente a 300 µg) foram adicionadas às esferas magnéticas e 100 µl de sulfato de amônio 3M foi acrescentado lentamente para evitar a precipitação de proteínas. Essas esferas foram incubadas nessa condição, durante 72 horas a 30°C sob agitação constante. Após isso, foram lavadas sequencialmente com 1 ml de cada solução: tampão fosfato pH 7,4 100 mM; Glicina pH 2,5 100 mM; Tris-HCl pH 8,8 10 mM; Trietilamina 100 mM; solução de PBS; Triton X-100 0,5% em PBS e, novamente, solução de PBS. As esferas foram suspensas em 150 µl de PBS e estocadas a 4°C até o momento do uso.

3.18.2. Preparação de extrato proteico por *Cryogrinding*

O equivalente a 3 g de ambos parasitas (*T. cruzi*) selvagem e expressando a proteína fusionada GFP foi centrifugado a 5.000xg durante 5 minutos, lavadas em PBS contendo inibidor de protease (COMPLETE Mini Protease inhibitor cocktail tablet, Roche), centrifugadas novamente e o sobrenadante foi descartado. As células foram suspensas na solução de PBS remanescente, rapidamente congeladas por gotejamento do *pellet* diretamente em Nitrogênio líquido e o tubo foi mantido em gelo seco até total evaporação do Nitrogênio. As células congeladas foram lisadas mecanicamente pela técnica de *Cryogrinding* utilizando o moedor Planetary Ball PM 100 (Retsch) com injeção de Nitrogênio líquido diretamente à amostra. Assim, após moagem das amostras, foi obtido um “pó de células” de espessura menor que 0,1 µm (detalhes técnicos do equipamento podem ser obtidos em <http://www.retsch.com/>)

3.18.3. Isolamento de complexos proteicos

Diferentes tampões foram testados para solubilização do pó contendo o extrato proteico. Os testes para a imunoprecipitação de cada proteína podem ser conferidos nos Apêndices, nas figuras C e E. Foram padronizados os seguintes tampões de suspensão para: Sub2 (citrato de sódio 10 mM; Hepes pH 7,4 20 mM; MgCl₂ 1 mM; CaCl₂ 10 µM; e CHAPS 0,1%), Crm1 (citrato de sódio 250mM; Hepes pH 7,4 20 mM; MgCl₂ 1mM; CaCl₂ 10 µM; e CHAPS 0,1%) e Hel45 (citrato de sódio 50 mM; Hepes pH 7,4 20 mM; MgCl₂ 1 mM; CaCl₂ 10 µM e TritonX-100 0,1%). Assim, a quantidade de 50 µg do pó foi suspensa em 1 ml desse tampão suplementado com inibidor de protease (COMPLETE Mini Protease inhibitor cocktail tablet, Roche), sonicada uma vez em potência 1 por 2 segundos e a mistura foi centrifugada a 20.000xg durante 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi coletado em novo tubo, foram adicionados 3 µl da esfera magnética com *nanodoby* anti-GFP conjugado previamente preparada, e a suspensão foi incubada sob agitação constante a 4°C durante duas horas. Em seguida, a esfera magnética foi lavada três vezes com o mesmo tampão de suspensão e a eluição foi realizada com 50 µl de tampão de eluição (SDS 2% e 20 mM Tris-HCl pH 8,0) aquecido a 72°C durante 20 minutos. Uma alíquota de 7 µl da amostras foi analisada em gel SDS-PAGE comercial, conforme descrito no item 3.6.2, e restante do material (43 µl) foi

precipitado com Etanol 100% para um volume final de 500 µl, durante 16 horas a -20°C. Após isso, foram suspensas em 50 µl de Etanol 100%.

O processamento das amostras e análise de espectrometria de massas foram realizados pela plataforma de proteômica da Universidade de Dundee (Reino Unido). Desse modo, as amostras foram submetidas à corrida eletroforética de dois centímetros em um gel comercial NuPAGE® Novex Bis-Tris Gel 10% (Life Technologies), conforme recomendação do fabricante. Em seguida, as amostras foram excisadas do gel com um bisturi e lavadas nas seguintes soluções: água, 200 µl de Acetonitrila, 200 µl de solução de Bicarbonato de amônio 100 mM, 200 µl de solução contendo 50% Acetonitrila e 50% Bicarbonato de amônio 100 mM e 100 µl de Acetonitrila 100%. As amostras em gel foram desidratadas em SpeedVac (Thermo Scientific) e, em seguida, foi realizada redução dos peptídeos com 50 µl de DTT 10 mM (diluído em Bicarbonato de amônio 20 mM) a 56°C durante 1 hora, seguido de Iodoacetamida 50 mM a temperatura ambiente durante 30 minutos. O gel foi lavado com 200 µl de Bicarbonato de amônio 100 mM, 200 µl de solução contendo 50% Acetonitrila e 50% Bicarbonato de amônio 100 mM e 100 µl de Acetonitrila 100%, novamente desidratado com em SpeedVac (Thermo Scientific) e a digestão em gel foi realizada com tripsina 12,5 µg/ml (Modified Sequencing Grade, Roche) durante 18 horas a 30°C sob agitação. Em seguida, foi adicionado Acetonitrila 100%, centrifugado e o sobrenadante, contendo os peptídeos trípticos, foi coletado. Foram acrescentados 50 µl de Ácido fórmico 5%, novamente centrifugado e o material transferido para frascos de HPLC e analisado previamente no sistema Ultimate 3000 RS LCnano system (Thermo Scientific) acoplado a LTQ Orbitrap XL (Thermo). Assim, os peptídeos trípticos foram inicialmente capturados com o sistema Acclaim PepMap 100 (C18, 100 µM x 2 cm) e fracionados em uma coluna C18 Easy-Spray PepMap RSLC (75 µM x 50 cm) (Thermo Scientific) no cromatógrafo e transferidos para o espectrômetro de massas via fonte Easy-Spray a 50°C e voltagem de 1,3kV. O sistema OrbiTrap XL seguiu os seguintes parâmetros:

FTMS Full AGC Target:	500000,00
Ion Trap MSn AGC Target:	10000,00
Fill Time FTMS (ms):	500
Fill Time ITMS (ms):	150

Lock Mass: 445,120024

FT-MS:

Resolution: 60000
Mass Range (m/z): 335-1800
Scan Type: Full
Polarity: Positive
Data Type: Profile

IT-MS/MS:

Data Type: Centroid
Activation Type: CID
Min. Signal Required: 5000
Isolation Width: 2,00
Normalized Coll. Energy: 35,0
Default Charge State: 2
Activation Q: 0,250
Activation Time: 10,000

Após essa primeira verificação da qualidade da amostra, as análises de espectrometria foram realizadas com o sistema Ultimate 3000 RS LCnano system (Thermo Scientific) acoplado a um LTQ OrbiTrap Velos Pro (Thermo Scientific). Esse equipamento utilizou como parâmetros:

FTMS Full AGC Target: 1000000
Ion Trap MSn AGC Target: 5000,00
Fill Time FTMS (ms): 500
Fill Time ITMS (ms): 100

Lock Mass: 445,120024

FT-MS:

Resolution: 60000
Mass Range (m/z): 335-1800
Scan Type: Full
Polarity: Positive
Data Type: Profile

IT-MS/MS:

Data Type: Centroid
Activation Type: CID
Min. Signal Required: 5000
Isolation Width: 2.00
Normalized Coll. Energy: 35.0
Default Charge State: 2
Activation Q: 0.250
Activation Time: 10.00

3.19. Análise de dados proteômicos

Para as análises de proteômica realizadas com extrato proteico total, a identificação de proteínas, quantificação e validação foram feitos utilizando a plataforma MaxQuant (versão 1.3.0.5) (COX & MANN, 2008). A procura de espectros de massa no banco de dados foi realizada utilizando o processo Andrômeda (COX *et al.*, 2011), que está integrado no ambiente MaxQuant. A identificação de proteínas foi baseada nos bancos de dados de sequências de proteínas de *T. cruzi* [Esmeraldo-like, não Esmeraldo-like e contigs sem atributos, versão 4.2 acessado em 15 de agosto de 2012 disponível em <http://tritrypdb.org/tritrypdb/> (ASLETT *et al.*, 2010)]. A abordagem de "decoy", para mensuração dos erros, foi usada através de geração de um banco teórico de sequências invertidas de cada sequência regular de entrada. Esse banco de erros

teóricos foi complementado com contaminantes freqüentemente observados (tripsina suína, endopeptidase lysyl de *Achromobacter lyticus* e queratina humana) e também com suas sequências invertidas. Parâmetros de pesquisa foi definida em tolerância MS de 7 ppm, tolerância MS/MS de 0,5 Da, completa especificidade de tripsina, permissão de até duas clivagens perdidas, permissão de 1% de erro para a identificação de proteína e de peptídeo calculado de forma independente. Carbamidometilação de cisteína foi selecionado como uma modificação fixa e oxidação de metioninas e acetilação N-terminal (proteína) como modificações variáveis. Para a validação das identificações, um mínimo de seis aminoácidos para tamanho do peptídeo e dois peptídeos por proteína foram utilizados. Além disso, uma linha de corte para taxa de falsos positivos (FDR - *false discovery rate*) foi estabelecida em 0,01 e aplicado a ambos peptídeos e proteínas. A análise de expressão foi realizada usando a ferramenta R do pacote Limma que utiliza modelos lineares para a avaliação da expressão diferencial (SMYTH, 2004). Após a análise, os p-valores foram ajustados usando o método Benjamini-Hochberg (BH) (BENJAMINI & HOCHBERG, 1995) para controle de FDR. Apenas as proteínas com FDR igual ou menor do que 0,01 foram selecionados para posterior análise.

Para os espectros obtidos durante os ensaios utilizando as amostras de imunoprecipitação, as análises dos dados foram realizadas utilizando a ferramenta Mascot Search Engine (Version 2.3.2) (<http://www.matrixscience.com/>) contra o banco de sequências de proteínas de *T. cruzi* do Uniprot (54.500 sequências) de 5 cepas diferentes de *T. cruzi* (CL Brener Esmeraldo-like, CL Brener não Esmeraldo-like, Sylvio, Dm28c e Marinkellei). Essa estratégia foi utilizada para aumentar a cobertura dos peptídeos identificados. A abundância de proteínas foi inferida a partir do número total de espectros de MS/MS gerados de péptídeos relacionados à mesma (LIU *et al.*, 2004). A quantificação relativa aproximada das proteínas presentes nos complexos foi estimada de modo *label-free* e através do índice de abundância proteica exponencialmente modificado (*emPAI*), determinado em uma mistura baseado na cobertura dos peptídeos da proteína identificada (ISHIHAMA *et al.*, 2005). Assim, o valor de *emPAI* é determinado pela fórmula abaixo:

$$emPAI = 10^{\frac{N_{observado}}{N_{observável}}} - 1$$

$N_{observado}$ refere-se ao número de peptídeos observados experimentalmente e $N_{observável}$ é o número calculado de peptídeos para cada proteína através de digestões determinadas *in silico*. As buscas seguiram os seguintes parâmetros: taxa de falsos positivos (FDR) de 1% e os peptídeos que apresentaram valor estatisticamente significativo de p-valor ≤ 0.05 . *emPAI* é diretamente proporcional à abundância absoluta de uma dada proteína em uma amostra de conteúdo proteico total conhecido (ISHIHAMA *et al.*, 2005). Desse modo, o índice absoluto de *emPAI* para cada proteína do controle foi subtraído do valor obtido das amostras imunoprecipitadas no extrato testado e o resultado final foi considerado de alta confiança para valores acima de 1,5.

4. RESULTADOS

4.1. CAPÍTULO 1

“Identification of a novel nucleocytoplasmic shuttling RNA helicase of Trypanosomes”

(Identificação de uma RNA helicase de Trypanosomas que migra entre o núcleo e o citoplasma)

Publicado em 2014: PLoS ONE 9(10): e109521. doi: 10.1371/journal.pone.0109521

Autores: Alexandre Haruo Inoue, Mariana Serpeloni, Priscila Mazzocchi Hiraiwa, Sueli Fumie Yamada-Ogatta, João Renato Carvalho Muniz, Maria Cristina Machado Motta, Newton Medeiros Vidal, Samuel Goldenberg, Andréa Rodrigues Ávila

Neste capítulo, alguns resultados da tese foram compilados em um primeiro manuscrito publicado na revista PloS One (doi: 10.1371/journal.pone.0109521), descrevendo a identificação de Hel45 como uma RNA helicase que funcionalmente migra entre o núcleo e o citoplasma. Hel45 está anotada nos bancos de dados de *T. cruzi* como uma RNA helicase dependente de ATP com massa molecular predita de 45 kDa (Genes alelos: Tc00.1047053506587.40 e Tc00.1047053506929.60 / GI = 71418343) e pertencente à família DEAD/H. Proteínas dessa família apresentam nove motivos conservados e agrupados em dois domínios que se estruturam em dobramentos tipo RecA e estão envolvidos na atividade RNA helicase a partir da ligação e hidrólise de ATP (CORDIN *et al.*, 2006; LINDER, 2006). O domínio amino terminal contém o motivo Q para o acoplamento e posicionamento de ATP, I (conhecido por Walker A) e II (Walker B) para a atividade ATPase; III, para a intermediação entre hidrólise de ATP e atividade helicase; e, Ia e Ib, envolvidos na ligação ao RNA. O domínio C-terminal apresenta os motivos IV e V que também estão relacionados à ligação ao RNA e o motivo VI que coordena as atividades ATPase e helicase (CORDIN *et al.*, 2006). Nesta publicação do grupo, destacamos a similaridade de Hel45 com diferentes RNA helicases. Apesar de também ser similar a Dbp5 de fungos, envolvido na liberação do mRNA para maquinaria de tradução no citoplasma, a similaridade de Hel45 foi maior com proteínas que pertencem ao grupo de eIF4A (eIF4A - *eukaryotic initiation factor* 4A). Essa maior semelhança também foi

observada na modelagem molecular por homologia estrutural, pois a predição tridimensional de Hel45 foi baseada em estruturas de eIF4A de fungos e de humanos (número de acesso 2VSO e 2ZU6, respectivamente) e eIF4AIII de humanos (número de acesso 2HYI, 2J0S e 2HXY) depositadas no banco de dados de proteína PDB. Na estrutura predita (Figura 1 do artigo) foi possível verificar que Hel45 apresentou os domínios amino e carboxi-terminal, típicos de RNA helicases, e conservação dos nove motivos. Baseado nesses dados de bioinformática, iniciamos as análises funcionais que evidenciassem o papel de Hel45 no metabolismo de mRNA e na via de exportação de mRNA de *Trypanosoma cruzi*.

Apesar de a análise comparativa demonstrar similaridade com fatores de iniciação da tradução (eIF4A), Hel45 não esteve presente em complexos associados à tradução (Figuras 2A e 2B), embora forme complexos com RNAs mensageiros (Figuras 2C e 2D). Dados da localização celular mostraram que Hel45 foi encontrado nos compartimentos nuclear e citoplasmático, com aglomeração em regiões características de poro nuclear (Figura 3C.2). Dentro do núcleo, Hel45 se concentrou em periferia de cromatina eletrodensa, região que pode estar relacionada à transcrição e ao processamento de mRNAs (Figura 3C.1). Assim, essa marcação em ambos os compartimentos sugeriu a capacidade de migração nucleocitoplasmática de Hel45. Para testar essa hipótese, foi realizada a busca na sequência de Hel45 por sinais específicos que indiquem seu transporte a partir da predição pelo programa NESsential (FU *et al.*, 2011). A proteína apresentou a probabilidade de 31% para a predição em nível de proteína, ou seja, a probabilidade de uma dada proteína conter um NES por, principalmente, análises de conservação de sequência primária, de regiões desordenadas e de acessibilidade a solventes. Já para a predição em nível de sequência (probabilidade de sítios putativos serem funcionalmente um NES), abaixo estão apresentadas as sequências candidatas acompanhadas da predição entre parênteses:

255-LYDTLTI-261 (0.63)

166-LKTLVL-171 (0.14)

207-VDVLEM-212 (0.11)

193-IPPLQV-198 (0.11)

201-VSATLPV-207 (0.09)

25-FEAMGL-30 (0.09)

79-ICLLQV-84 (0.07)
334-LNYDLPF-340 (0.06)
196-LQVVLV-201 (0.06)
236-MQYFVAV-242 (0.05)
114-IGHHMGL-120 (0.05)
138-LESGVQI-144 (0.05)
192-MIPPLQV-198 (0.04)
261-IAHAVIF-267 (0.03)
49-IQKRFIV-55 (0.03)
327-VEQVSL-332 (0.03)
217-MTEPVRI-223 (0.03)

Desse modo, a sequência candidata 255-LYDTLTI-261 com maior probabilidade de ser um NES (63%), localizada estruturalmente próxima à extremidade carboxi-terminal (Figuras 1B e 1C), foi testada. A deleção dessa sequência de Hel45 (Figura S1) resultou no acúmulo nuclear da proteína (Figura 4A), indicando que a exportação é dependente possivelmente de um receptor que interage com NES. Entretanto, esse sinal aparentemente não é reconhecido pela exportina Crm1, uma vez que o tratamento de parasitas com leptomicina B, droga que especificamente inibe Crm1 (CUEVAS *et al.* 2005), não alterou a localização de Hel45 (Figura 6A). O transporte de Hel45 somente foi impedido quando a transcrição foi inibida (Figura 5A) e quando o RNAi em *T. brucei* foi induzido contra o ortólogo e receptor Mex67 (Figuras 6E.1 e S3). Neste último caso, além de Hel45, os mRNAs poliadenilados também ficaram acumulados no núcleo (Figuras 6E.1 e S2). Esses dados indicam que esta RNA helicase está associada com o controle pós-transcricional em *T. cruzi* e sua migração envolve uma via de exportação de mRNA pelo receptor Mex67. Todos os dados resumidos acima podem ser lidos na integra no trabalho abaixo.



Identification of a Novel Nucleocytoplasmic Shuttling RNA Helicase of Trypanosomes

Alexandre Haruo Inoue¹, Mariana Serpeloni^{1,2}, Priscila Mazzocchi Hiraiwa¹, Sueli Fumie Yamada-Ogatta³, João Renato Carvalho Muniz⁴, Maria Cristina Machado Motta⁵, Newton Medeiros Vidal^{1,6}, Samuel Goldenberg¹, Andréa Rodrigues Ávila^{1*}

1 Instituto Carlos Chagas, FIOCRUZ, Curitiba, Brazil, **2** Departamento de Biologia Celular e Molecular, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Brazil, **3** Departamento de Microbiologia, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Brazil, **4** Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, Brazil, **5** Departamento de Biologia Celular e Parasitologia, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil, **6** National Center for Biotechnology Information, National Library of Medicine, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, United States of America

Abstract

Gene expression in trypanosomes is controlled mostly by post-transcriptional pathways. Little is known about the components of mRNA nucleocytoplasmic export routes in these parasites. Comparative genomics has shown that the mRNA transport pathway is the least conserved pathway among eukaryotes. Nonetheless, we identified a RNA helicase (Hel45) that is conserved across eukaryotes and similar to shuttling proteins involved in mRNA export. We used *in silico* analysis to predict the structure of *Trypanosoma cruzi* Hel45, including the N-terminal domain and the C-terminal domain, and our findings suggest that this RNA helicase can form complexes with mRNA. Hel45 was present in both nucleus and cytoplasm. Electron microscopy showed that Hel45 is clustered close to the cytoplasmic side of nuclear pore complexes, and is also present in the nucleus where it is associated with peripheral compact chromatin. Deletion of a predicted Nuclear Export Signal motif led to the accumulation of Hel45ΔNES in the nucleus, indicating that Hel45 shuttles between the nucleus and the cytoplasm. This transport was dependent on active transcription but did not depend on the exportin Crm1. Knockdown of Mex67 in *T. brucei* caused the nuclear accumulation of the *T. brucei* ortholog of Hel45. Indeed, Hel45 is present in mRNA ribonucleoprotein complexes that are not associated with polysomes. It is still necessary to confirm the precise function of Hel45. However, this RNA helicase is associated with mRNA metabolism and its nucleocytoplasmic shuttling is dependent on an mRNA export route involving Mex67 receptor.

Citation: Inoue AH, Serpeloni M, Hiraiwa PM, Yamada-Ogatta SF, Muniz JRC, et al. (2014) Identification of a Novel Nucleocytoplasmic Shuttling RNA Helicase of Trypanosomes. PLoS ONE 9(10): e109521. doi:10.1371/journal.pone.0109521

Editor: Alexander F. Palazzo, University of Toronto, Canada

Received: April 29, 2014; **Accepted:** September 11, 2014; **Published:** October 14, 2014

Copyright: © 2014 Inoue et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability: The authors confirm that all data underlying the findings are fully available without restriction. All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

Funding: Funding was provided by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundação Oswaldo Cruz (PAPES-FIOCRUZ Program) and Fundação Araucária-PR. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* Email: aravila@fiocruz.br

Introduction

Chagas disease is a neglected disease endemic to Latin America, where about eight million people are affected [1]. This disease is caused by infection with *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*). In addition to their medical importance, trypanosomatids are interesting experimental models because the regulation of gene expression in these organisms have some unusual features. Several genes are grouped together under the control of a single promoter region [2,3] and give rise to long polycistronic transcripts. These transcripts are processed by *trans*-splicing and polyadenylation to form monocistronic messenger RNA (mRNA) [4,5,6]. The resulting mature mRNAs are then transported from the nucleus to the cytoplasm, where protein synthesis occurs. Gene expression is controlled mostly by post-transcriptional events and the mechanisms controlling mRNA processing [4,5,6] and stability [7,8,9] are becoming increasingly understood. However, little is known about the mechanisms of mRNA nucleocytoplasmic transport in

these parasites, and the identity of factors that determine the fate of mRNA in the cytoplasm remains to be unveiled.

In yeast and mammalian cells, the bidirectional translocation of macromolecules between the nucleus and cytoplasm (e.g. RNAs to the cytoplasm and transcription factors to the nucleus) involves the nuclear pore complex (NPC), which is composed largely of nucleoporins [10]. The NPC mediates the transport of molecules by interacting transiently with proteins from the β -karyopherin family [11], which are conserved nuclear receptors known as importins and exportins [12]. Crm1 is the major exportin in many organisms [13]. It recognizes a nuclear export sequence (NES) motif in shuttling proteins and its activity is dependent on RanGTP [14,15]. Only some mRNAs are transported by Crm1 [16,17,18,19]. Instead, most mRNAs are exported by the Mex67 receptor [19], which does not belong to the karyopherin family and functions in a RanGTP-independent manner. During transcription, RNA-binding proteins of the THO complex associate with the nascent mRNA and initiate the formation of

the ribonucleoprotein complex (mRNP). This involves the recruitment of processing and export factors, such as Sub2 and Yra1, resulting in the formation of the transcription/export (TREX) complex. The TREX complex interacts with the spliceosome and processed mRNAs are exported through the NPC by the Mex67 receptor and are disassembled in the cytoplasm by the ATP-dependent helicase Dbp5 (DDX19 in humans) [20,21]. Comparative genomic analyses have demonstrated that the mRNA export pathway is poorly conserved in many parasites, including *T. cruzi* [22], suggesting distinct mechanisms in mammals and parasites.

In this study, we investigated the function of an ATP-dependent DEAD/H RNA helicase (Hel45) in *T. cruzi*. We show that Hel45 shuttles between the nucleus and cytoplasm and is located near to NPCs. We demonstrate that the export of Hel45 is dependent on transcription and we show that it forms ribonucleoprotein complexes not associated with polysomes in the cytoplasm. We also show that Hel45 has a nuclear export signal and its shuttling is dependent on an mRNA export pathway, involving a homolog of the Mex67 nuclear receptor. Our findings also suggest that this protein is involved in mRNA metabolism and its nucleocytoplasmic shuttling is dependent on an mRNA export route involving Mex67 receptor.

Materials and Methods

In silico analyses

Bioinformatic searches were locally performed using the BLASTP algorithm [23] and *Trypanosoma cruzi* Hel45 (GI: 71418343) as query sequence. Proteome sequences from representative species of different eukaryotic groups were downloaded from the National Center for Biotechnology Information (NCBI) Reference Sequence (RefSeq) database [24]. Analyzed species included: *Saccharomyces cerevisiae* (Fungi), *Homo sapiens* (Metazoa), *Dictyostelium discoideum* (Amoebozoa), *Arabidopsis thaliana* (Plantae), *Plasmodium falciparum* (Chromalveolata), *Toxoplasma gondii* (Chromalveolata), *Trypanosoma cruzi* (Excavata), *Trypanosoma brucei* (Excavata), and *Leishmania major* (Excavata). Multiple sequence alignment of the region (positions 25–365 according to Hel45) comprising the nine diagnostic conserved motifs of DEAD-box helicases were performed using MUSCLE [25]. Identity and similarity percentages were obtained using needle program from the EMBOSS package [26].

Structural homology-based molecular modeling of Hel45 (GeneID 3541696) was carried out by protein searches with the BLASTP of the protein data bank (PDB) database [27]. Alignments of proteins, based on primary and secondary structures, with low levels of sequence identity were generated with the GenTHREADER program [28]. A model was constructed with MODELLER 9v11 [29]. Figures of the structural model were generated with PyMOL software (available at <http://www.pymol.org>).

The program NESsential [30] (available from <http://seq.cbrc.jp/NESsential/>) was used for the prediction of classical nuclear export signal (NES) and PredictNLS (available from <https://roslab.org/owiki/index.php/PredictNLS>) was used for the prediction of nuclear localization signal (NLS) sequences.

Parasite cultures

T. cruzi Dm28c epimastigotes [31] were maintained in axenic culture in liver infusion tryptose (LIT) medium at 28°C. For drug assays, parasites were treated with 500 ng/ml leptomycin B (Sigma-Aldrich) or 50 µg/ml actinomycin D (Sigma-Aldrich) at 28°C.

RNA interference assay was carried out with procyclic forms of *Trypanosoma brucei* Lister 427 29-13 [32]. *T. brucei* were maintained in SDM-79 medium at 28°C supplemented with 10% fetal bovine serum, G418 (15 µg/ml) and hygromycin (50 µg/ml).

Polyclonal antibody production

The Hel45 open reading frame (ORF) was amplified by PCR with the oligonucleotide primers Hel45F and Hel45R (Table 1). *T. cruzi* Dm28c was used as the DNA template. The PCR product was cloned into the pDONRTM221 vector from Gateway technology (Invitrogen) and was then recombined into the pDESTTM17 vector (Invitrogen) to produce a his-tagged Hel45 recombinant, according to the manufacturer's protocol. Production of recombinant protein was induced in *Escherichia coli* BL21 (DE3) by addition of 1 mM IPTG and incubation for 3 h at 37°C. His-tagged Hel45 protein was purified by affinity chromatography on Ni-NTA resin (Qiagen) under denaturing conditions, and was used to inoculate mice to produce polyclonal antibodies (according to De Souza *et al.* (2010) [33]).

Immunoblotting

Proteins were separated by gel electrophoresis (SDS-PAGE) and transferred to a nitrocellulose membrane (Hybond C, Amersham Biosciences). The membrane was blocked with 0.1% Tween 20 and 5% milk in phosphate-buffered saline (PBS). Primary antibodies were diluted in blocking solution at the following concentrations: mouse anti-Hel45 (diluted 1:500), mouse anti-PABPI (diluted 1:100); mouse anti-H2A (kindly provided by Gisele Fernanda Assine Picchi, diluted 1:250); rabbit anti-Protein A (Sigma-Aldrich, diluted 1:40,000); mouse anti-Mex67 (diluted 1:50); mouse anti-GAPDH (diluted 1:500, kindly provided by Flávia S. Pereira de Souza) and anti-S7 (diluted 1:1,000).

Antibodies were incubated with the membrane for 1 hour. The membrane was then washed three times in 0.1% Tween 20 in PBS. Bound antibodies were detected by the alkaline phosphatase [34] or peroxidase [33] method.

The nuclear and cytoplasmic extracts for cellular fractionation analysis were obtained by hypotonic lysis of epimastigote forms, as described by Roberts *et al.* (1998) [35].

Light microscopy

The modified pTcGW vector [36] was used to tag the NT with PTP [37]. The oligonucleotides used to clone the Hel45 ORF are shown in Table 1. The nuclear export signal was deleted by fusion PCR. For this, two fragments of Hel45 were amplified by PCR with the Hel45F/NESR and NESF/Hel45R oligonucleotides (Table 1) and these two amplicons were mixed prior to another round of PCR. The fragment obtained was sequenced and inserted into the pTcGW vector to create a Hel45ΔNES mutant tagged at its N-terminal end with PTP.

T. cruzi epimastigotes were transfected with these plasmids, as described by Lu *et al.* (1991) [38]. Stable lines were selected by adding 500 µg/ml G418 to the culture medium. The endogenous and PTP-tagged Hel45 proteins were localized by indirect immunofluorescence assays, as described by Serpeloni *et al.* (2011) [39]. Mouse anti-Hel45 polyclonal antibodies (1:100 dilution) or rabbit anti-protein A (ProtA) antibodies (1:40,000 dilution) were incubated with the parasites for 1 hour at 37°C. The parasites were then washed with PBS and incubated with Alexa Fluor 488-conjugated goat anti-mouse IgG, Alexa Fluor 633-conjugated rabbit anti-mouse IgG or Alexa Fluor 594-conjugated goat anti-rabbit IgG antibodies (Invitrogen, 1:600 dilution), as

Table 1. Oligonucleotides used for PCR.

Primers	Sequence	Use
Hel45F	5' GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTC ATGGGAGACGTCGAGCAAATAG 3'	Hel45 ORF amplification
Hel45R	5' GGGGACCACCTTTGTACAAGAAAGCTGGTCT CTAGAAGTGGTCCGCAATATTGCA 3'	Hel45 ORF amplification
NESF	5' AATTTGAACTCTCTGCGACGCCATGCCGTTATCTTCTG 3'	NES deletion
NESR	5' CAGAAGATAACGGCATGGCGTCGAGAGATTTCAAAT 3'	NES deletion
Mex67RNAiF	5' <u>CCCAAGCTTTGTTAAACCCACTGGAAGGC</u> 3	Mex67 RNAi
Mex67RNAiR	5' <u>CGGGATCCAACACACGAGTGAAGTTGCG</u> 3'	Mex67 RNAi

Restriction endonuclease sites are underlined and attB recombination sites are shown in bold.

doi:10.1371/journal.pone.0109521.t001

appropriate, for 1 hour. DNA was stained by incubation with 5 µg/ml DAPI for 15 minutes. Slides were analyzed by fluorescence microscopy (Nikon E600) and images were captured with a CoolSnap PROc (Media Cybernetics) camera and were analyzed with Image Pro-Plus v. 4.5.1.22 (Media Cybernetics). Images were also obtained by inverted microscopy (Leica DMI6000B) associated with deconvolution software Leica AF6000 (microscope facility RPT07C PDTIS/Carlos Chagas Institute - Fiocruz Paraná).

Ultrastructural microscopy

Ultrastructural immunocytochemistry of Hel45 in *T. cruzi* epimastigote forms were performed as described by Motta *et al.* (2003) [40]. Samples were blocked for 30 minutes with 3% BSA, 0.5% teleostean gelatin, and 0.02% Tween 20 in PBS pH 8.0, and were then incubated with anti-Hel45 antiserum (1:50 dilution) for 1 hour. The parasites, on grids, were treated for 30 minutes with blocking solution and were incubated with 10 nm gold-labeled anti-mouse IgG (Sigma-Aldrich) diluted 1:250 in blocking solution. The grids were washed in blocking solution, stained with uranyl acetate and lead citrate, and were observed with a Zeiss EM-900 transmission electron microscope.

Mex67 RNAi interference

The ortholog of Mex67 in *T. brucei* was named TbMex67 (GeneID 3664369). For gene knockdown by RNA interference, the region corresponding to 362–845 of the nucleotide sequence was chosen with the RNAi program [41]. A DNA fragment was amplified with the oligonucleotides Mex67RNAiF (forward) and Mex67RNAiR (reverse) (Table 1) for cloning into the p2T7-117 vector [42]. A total of 10 µg insert-containing vector was linearized with NotI enzyme and was transfected into procyclic forms of *T. brucei* 29-13 cell line [32].

Transfected parasites were selected by the addition of 5 µg/ml phleomycin to the medium. RNAi was induced by adding 2 µg/ml tetracycline to log phase parasites, and the knockdown confirmed by western blotting with polyclonal antisera anti-Mex67. Anti-GAPDH was used as a loading control.

Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) for the detection of mRNA

For the detection of poly(A)⁺ RNA in *T. brucei* and *T. cruzi*, the parasites were harvested, washed in PBS (pH 7.4), fixed by incubation in 4% paraformaldehyde and were allowed to adhere to poly-L-lysine-coated slides for 10 minutes. The slides were washed in PBS and the parasites were permeabilized by

incubation with 0.2 M HCl (diluted in PBS) for 10 minutes. For *T. cruzi*, the cells were incubated with prehybridization buffer (35% formamide, 0.02% BSA in 2X SSC buffer) supplemented with 25 µg/ml tRNA, 1 mg/ml salmon sperm DNA (Sigma-Aldrich) and 40 U/ml RNaseOUT (Invitrogen) for 30 minutes at 37°C. For *T. brucei*, the cells were incubated with prehybridization buffer containing 10X Denhardt's solution, 1 mM EDTA, 35% formamide in 4X SSC and supplemented with 0.5 µg/ml tRNA and 2 mU/ml RNaseOUT for 30 min at room temperature. Digoxigenin-conjugated oligo(dT) probes (6 ng/µl) were diluted in prehybridization buffer and denatured by heating at 65°C for 3 minutes. Hybridization was performed for 16 hours at 37°C. Probe binding was detected by indirect immunofluorescence analysis with mouse monoclonal anti-digoxigenin antibody (Sigma-Aldrich, 1:300 dilution) and Alexa Fluor 488-conjugated goat anti-mouse IgG secondary antibody (Invitrogen, 1:600 dilution), as described previously. As a control, 100 µg/ml RNase A was added to the pretreatment buffer before probe hybridization.

Polysome sedimentation profiles

Polysome sedimentation profiles were obtained by the ultracentrifugation of cytoplasmic extracts (1×10^9 cells) of epimastigotes on sucrose density gradients. The cells were treated with 100 µg/ml cycloheximide for 10 minutes at 28°C and were harvested by centrifugation at 5,000×g. Parasites were washed in cold TKMC buffer (10 mM Tris-HCl pH 7.4; 10 mM MgCl₂; 300 mM KCl) supplemented with 100 µg/ml cycloheximide. Cell pellet was resuspended in 900 µl TKMC buffer supplemented with 100 µg/ml cycloheximide, 10 µg/ml heparin, 10 µM E-64, 10 mM PMSF and was transferred to a new tube containing 100 µl TKMC buffer to which 10% (v/v) NP-40 and 2 M sucrose were added. The lysate was centrifuged at 16,000×g at 4°C for 5 minutes and 500 µl of cleared supernatant was centrifuged on a linear sucrose density gradient from 15 to 55% [43]. For micrococcal nuclease treatment, the supernatant was incubated with 500 U/ml micrococcal nuclease in the presence of 2 mM CaCl₂ for 30 min, and the reaction was blocked by adding 2.5 mM EGTA.

Parasites were treated with 2 mM puromycin for 1 hour at 28°C and were then washed in cold TKMP buffer (10 mM Tris-HCl pH 7.4, 2 mM MgCl₂, 500 mM KCl). Cells were centrifuged at 5,000×g and were resuspended in 900 µl TKMP buffer supplemented with 10 µg/ml heparin, 10 µM E-64, 10 mM PMSF and 1 mM puromycin. Parasites were lysed with 100 µl TKMP buffer supplemented with 10% (v/v) NP-40 and 2 M sucrose. The cell lysate was centrifuged and 500 µl of the clear

supernatant was layered onto a sucrose density gradient (15–55%) prepared with TKMP buffer. All gradients were centrifuged at 192,000×g for 2 hours at 4°C and fractions were separated with an ISCO gradient fractionation system. Aliquots of 30 µl of each fraction were collected for western blotting with mouse anti-Hel45 and mouse anti-S7 antibodies.

mRNP isolation

The cytoplasmic fraction of epimastigotes was obtained by hypotonic lysis, as described by Roberts *et al.* (1998) [35]. Poly(A)⁺ molecules were isolated from the cytoplasmic extract with 1 mg magnetic oligo(dT)-conjugated beads from the PolyAtract mRNA Isolation System IV (Promega) according to the manufacturer's protocol. Cytoplasmic extracts were incubated with the beads for 16 hours at 4°C. The beads were washed three times with hypotonic buffer containing 5 mM 2-mercaptoethanol and 1% NP-40, and bound particles were eluted with 0.2% SDS with heating at 95°C for 5 minutes. As a control, 10 µg/ml RNase A was added to the protein extract before its incubation with beads.

Results

Comparative analysis and prediction of the structure of the ATP-dependent DEAD/H RNA helicase (Hel45)

Previous analysis demonstrated the existence of a *T. cruzi* protein sequence that we named Hel45, conserved across different eukaryotic supergroups examined, including several species of Excavata and Chromalveolata [22]. It is a protein with a predicted molecular weight of 44.9 kDa that belongs to the ATP-dependent DEAD/H RNA helicase family. Comparative analyses by multiple sequence alignment demonstrated that the nine characteristic motifs (*Q*, *I*, *Ia*, *Ib*, *II*, *III*, *IV*, *V*, *VI*) of the DEAD-box helicase protein family [44] were conserved in Hel45 (Figures 1A and 1B). Besides, we observed that Hel45 is similar to shuttling proteins involved in mRNA export routes, as DBP5/DDX19 [45] and the eukaryotic initiation factor 4AIII (eIF4AIII) [46,47]. This comparative analysis showed that Hel45 is more similar to eIF4A group than to DBP5/DDX19 group of RNA helicases. It had 80.7%, 76.8% and 76.0% of similarity to the eIF4AIII in humans, yeast, and *P. falciparum*, respectively (Table S1). Whereas the similarity with DBP5/DDX19 in humans, yeast and *P. falciparum* was 60.8%, 60.3%, and 52.7%, respectively (Table S1). Hel45 is highly conserved in other trypanosomatids, showing 92.7% and 82.1% of identity, and 97.4% and 91.8% of similarity with *T. brucei* and *L. major*, respectively (Table S1).

We used molecular modeling to predict the structure of Hel45 (Figure 1C) based on structural similarity with related proteins (yeast and human eIF4A; accession numbers in the protein database: 2VSO and 2ZU6, respectively, and human eIF4AIII; accession numbers in the protein database: 2HYI, 2JOS, and 2HXY). We sought to assess the potential role of the protein as an RNA helicase based on this structure. The predicted structure of the presumptive RNA helicase comprised two functional domains (Figure 1C): the N-terminal (NT) domain and the C-terminal (CT) domain. The model of this protein suggested a dynamic spatial conformation of the NT and CT domains, due to a deep cleft between these domains. The two domains were linked by a flexible loop, which is characteristic of proteins with RNA helicase activity.

Hel45 is present in ribonucleoprotein complexes not associated with polysomes in the cytoplasm

Comparative analysis suggests that Hel45 is very similar to the members of human eukaryotic initiation factor 4A group (eIF4A). We therefore carried out polysome fractionation to assess the

potential role of Hel45 in translation. We found that low-density polysome-independent fractions were enriched in Hel45 (Figure 2A). Remarkably, the sedimentation profile of Hel45 on the sucrose density gradient was not modified by treatment with puromycin (Figure 2B), in contrast with that of the ribosomal protein S7 (Figures 2A and 2B). The sedimentation profile of Hel45 was altered only by treatment of the cytoplasmic extract with micrococcal nuclease (Figure 2C). These results suggest that the sedimentation profile of Hel45 is dependent on RNA integrity. Moreover, mRNP precipitation with oligo(dT)-conjugated beads indicated that Hel45 was a component of ribonucleoprotein complexes in the cytoplasm (Figure 2D). These data demonstrate that Hel45 forms mRNPs, but is not associated with polysomes.

Hel45 is found in both the nucleus and the cytoplasm and clusters around NPCs

Western-blot analysis of cellular fractions of *T. cruzi* (Figure 3A.1) showed that about 70% of Hel45 is present in the cytoplasmic fraction and 30% is present in the nuclear fraction (Figure 3A.2). Indirect immunofluorescence assays showed that Hel45 was dispersed throughout the cytoplasm, but showed enrichment around the nucleus (Figure 3B). Ultrastructural immunocytochemical analysis of *T. cruzi* epimastigotes confirmed that Hel45 was present in both the nuclear and cytoplasmic compartments (Figures 3C.1 and 3C.2). In the nucleus, gold particles were present in the periphery of electron-dense chromatin regions and in the periphery of the nucleolus (Figure 3C.1). The protein was dispersed throughout the cytoplasm (not shown) and also accumulated close to NPCs (Figures 3C.1 and 3C.2).

A predicted nuclear export signal (NES) is essential for Hel45 shuttling between the nucleus and cytoplasm

The presence of Hel45 in the nucleus and cytoplasm suggests that it acts as a shuttling protein (Figure 3). We therefore searched for nuclear export signals (NES) with the NESsential program, which predicts NES sites on the basis of protein sequence, regional disorder and solvent accessibility criteria [30]. This program recognized a classic nuclear export signal at position 255–261 of the CT region, which consisted of the sequence LYDTLTI. The probability that this putative NES was functional was 63% based on sequence alone. The predicted NES motif is highlighted in Figures 1B and 1C (yellow region). The NES region is located at the end of a helix in the predicted structure (Figure 1C). Structural analysis showed that the side chains of amino-acids D257 and T258 located within the NES motif makes hydrogen-bonds with D393 in the CT region, which keeps the NES motif close to the α -helix (Figure 1C, detailed inset). We addressed the role of this signal by performing fusion PCR to delete the sequence corresponding to the predicted NES (Figure S1). This NES deletion significantly modified the distribution of Hel45, and caused its accumulation in the nucleus (Figure 4A). Western blot analyses confirmed the ectopic expression of tagged Hel45 (Figures 4B and 4C). We also investigated the presence of a conserved nuclear localization signal (NLS) with the PredictNLS program, but no such motif was identified in Hel45 (data not shown).

The inhibition of transcription blocks Hel45 export to the cytoplasm

We found that Hel45 is present in mRNP complexes (Figure 2); therefore, we examined whether blocking the transcription affects Hel45 nucleocytoplasmic export. The treatment of *T. cruzi* with actinomycin D (ACTD) resulted in the accumulation of Hel45 in

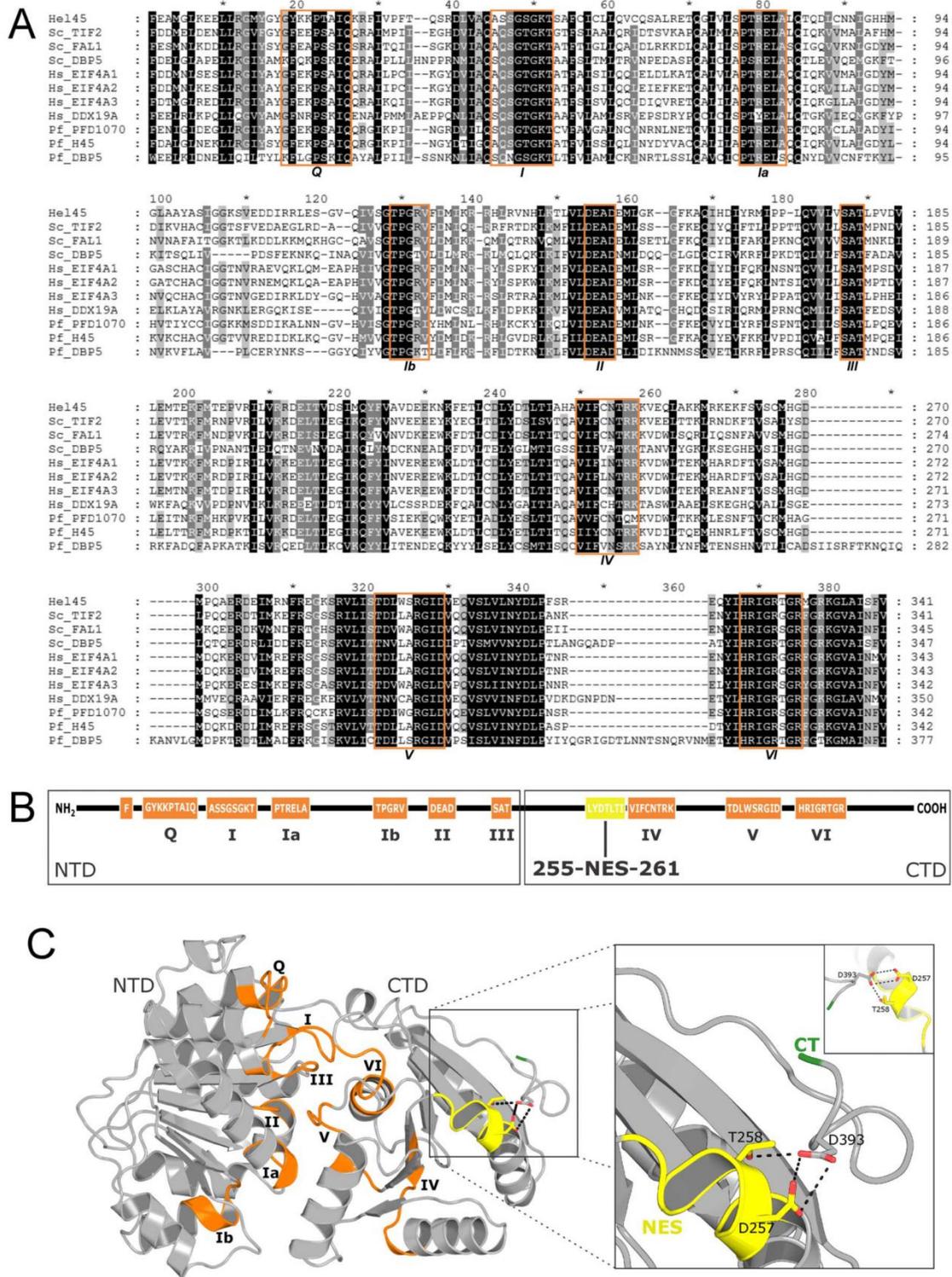


Figure 1. Multiple sequence alignment and prediction of the structure of Hel145. (A) Multiple sequence alignment of the diagnostic conserved region of the DEAD-box helicase family (positions 25–365 according to Hel145). The nine putative conserved motifs (Q, I (WalkerA), Ia, Ib, II (WalkerB), III, IV, V, VI) are marked with orange boxes. Alignment columns displaying 100%, more than 90%, and more than 80% of similarity are highlighted in black, dark grey, and light grey, respectively. Sequences are identified with organism abbreviation and gene name, except Hel145. The organism abbreviations are: Sc: *Saccharomyces cerevisiae*, Hs: *Homo sapiens*, Pf: *Plasmodium falciparum*. The sequences have the following GenBank Identifiers (GIs): Hel145 (71418343), Sc_TIF2 (6322323), Sc_FAL1 (398365053), Sc_DBP5 (6324620), Hs_EIF4A1 (4503529), Hs_EIF4A2 (83700235), Hs_EIF4A3 (7661920), Hs_DDX19A (8922886), Pf_PFD1070w (124505577), Pf_H45 (124810293), Pf_DBP5 (6324620). (B) Schematic representation showing the nine conserved helicase motifs are boxed in orange. The N-terminal domain (NTD) contains the motifs Q, I and II for ATP-binding, Ia and

Ib for RNA-binding, and III for ATP hydrolysis [44]. The C-terminal domain (CTD) contains the motifs IV and V for RNA-binding, and VI for ATPase and unwinding activities [44]. The predicted nuclear export signal (NES) in the LYDTLTI sequence (255–261 position) is shown in yellow. (C) Molecular modeling of Hel45. The nine motifs are highlighted in orange, the predicted NES (yellow) is close to the CT extremity (green). A zoom of this region (box) shows the side chains of amino-acids D257, T258 and D393, and the interactions that maintain the structure at its C-terminal extremity. The organization of the NES in the CT is shown in the inset (upper right corner).
doi:10.1371/journal.pone.0109521.g001

the nucleus (Figure 5A). For control of actinomycin D activity, it was observed the accumulation of mRNA in the nucleolus (Figure 5B), as previously described [48]. This suggests that Hel45 transport to the cytoplasm is dependent on active transcription.

Hel45 shuttling is dependent on Mex67 but not on the Crm1 protein

Crm1 is the major exportin in many organisms that recognizes nuclear export sequence (NES) motifs in shuttling proteins [14,15]. We first investigated if the exportin Crm1 is involved in Hel45 shuttling by treating epimastigotes with leptomycin B (LMB), which specifically inhibits Crm1 activity [49,50]. LMB did not alter the distribution of Hel45 (Figure 6A) even after treatment with lethal concentrations of the drug, or for long incubation times that affected the growth rate of parasite (Figure 6B). This indicates that Hel45 is not exported in a Crm1-dependent manner.

Mex67 is a nuclear mRNA export receptor in *Trypanosoma brucei* [51,52]. We hypothesized that shuttling of Hel45 occurs by an mRNA export pathway involving the receptor Mex67, because the export of Hel45 depends on transcription (Figure 5). We tested this hypothesis by knocking down the expression of Mex67 with an inducible system of RNAi in *T. brucei*, because *T. cruzi* does not have a functional RNA interference machinery [53] and lacks an inducible system for gene silencing. The protein orthologous to

Hel45 in *T. brucei* showed a predicted molecular weight of 45.51 kDa and we named this protein TbHel46. The amino acid sequence of Hel45 is 92.7% identical and 97.4% similar to that of TbHel46 (Table S1). We used an inducible RNAi system to knockdown the expression of TbMex67, as described previously [52]. The induction successfully prevented the expression of TbMex67 protein (Figure 6D) and impaired the growth of *T. brucei* (Figure 6C). TbMex67 RNAi induction also caused the accumulation of both polyadenylated mRNA (Figures 6E.1 and S2) and TbHel46 (Figures 6E.1 and S3) in the nucleus after 48 hours, which we quantified from the fluorescence intensity of labelling (Figures 6E.2 and 6E.3). This demonstrates that shuttling of TbHel46 depends on the Mex67-mRNA export pathway in trypanosomes.

Discussion

The mechanisms of molecular exchange between the nucleus and cytoplasm are well characterized in mammals and yeast. However, the proteins and mechanisms involved in the mRNA nucleocytoplasmic transport in several species of parasites are poorly understood. Trypanosomes branched off early from the metazoan lineage, which may account for the conservation of only a few proteins of the mRNA export network in these highly divergent organisms [22]. Regarding to comparative analyses of

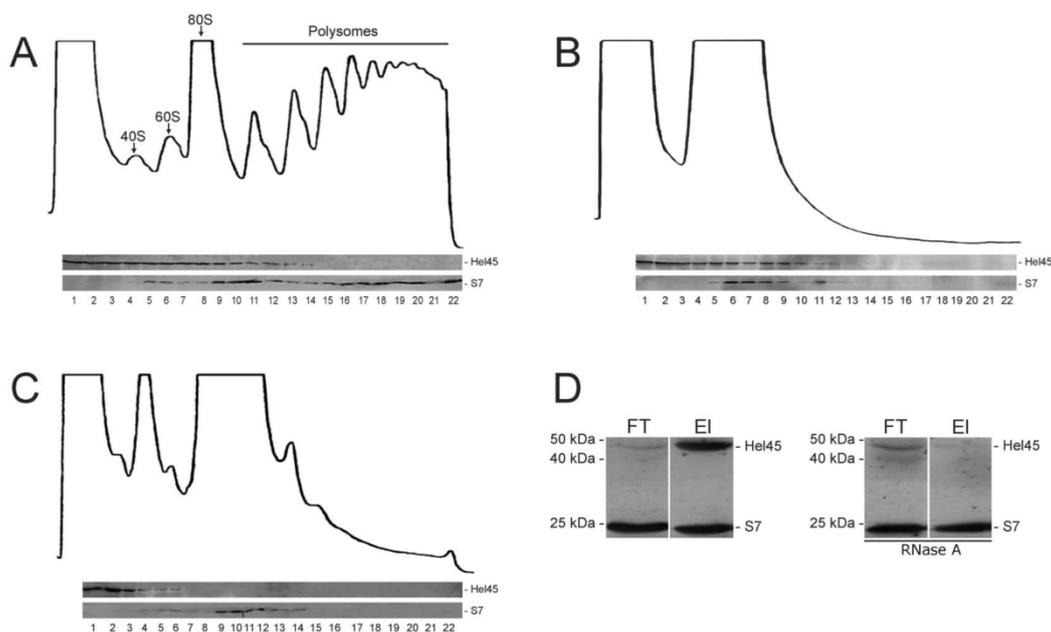


Figure 2. Hel45 is a component of ribonucleoprotein complexes in the cytoplasm. Polysome fractionation by sucrose density gradient. The fractions (1–22) were collected after the sedimentation of cytoplasmic extract from *T. cruzi* treated with 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ cycloheximide (A), 2 mM puromycin (B), or 500 U/ml micrococcal nuclease in the presence of 2 mM CaCl_2 (C). The 40S and 60S ribosomal subunits, the 80S ribosome monomer and polysomes are indicated. A western blot was performed with an anti-Hel45 antibody for each fraction. S7, a small ribosomal subunit protein, was used as a control. (D) mRNA-protein cross-linking assay. Western-blot analysis with anti-Hel45 and anti-S7 antibodies and mRNPs obtained from the *T. cruzi* cytoplasmic fraction after elution from oligo(dT)-conjugated magnetic beads (EI). As a control, cytoplasmic extract was treated with 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ RNaseA before mRNA capture. FT = flow-through from cytoplasmic extract not bound to the oligo(dT). EI = eluted fraction.
doi:10.1371/journal.pone.0109521.g002

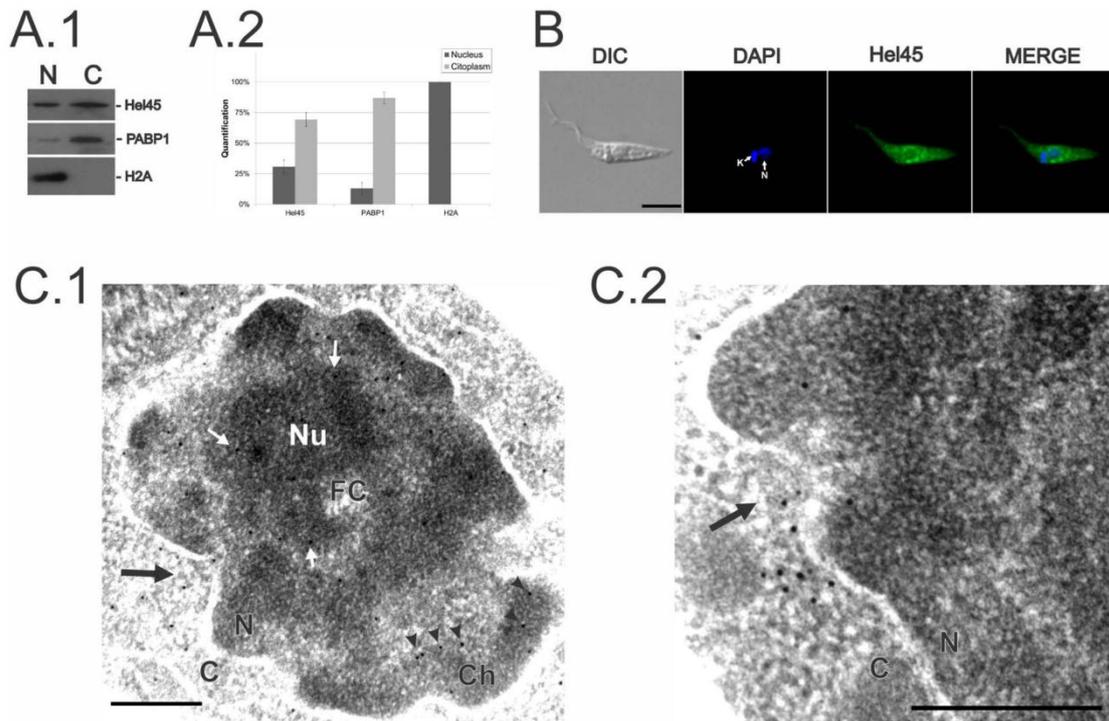


Figure 3. Cellular localization of Hel45 in *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. (A.1) Representative results of three independent western blots with cellular extract. N = nuclear extract. C = cytoplasmic extract. PABP1 was used as a cytoplasmic marker and histone H2A was used as a nuclear marker. (A.2) Quantification of western blots by densitometry. Data are expressed as means and standard deviation. (B) Detection of Hel45 by indirect immunofluorescence. DIC = differential interference contrast. DAPI = DNA stained with DAPI. Hel45 = endogenous Hel45. MERGE = merged DAPI and immunofluorescence images. N = nucleus. K = kinetoplast. Bar = 5 μ m. (C.1 and C.2) Ultrastructural microscopy by immunocytochemistry with anti-Hel45 antibodies and 10 nm colloidal gold-coupled anti-mouse IgG. Black arrows = Hel45 labeling on the cytoplasmic side of the NPC. White arrows = Hel45 labeling in perinucleolar regions. Arrowheads = Hel45 labeling in electron-dense chromatin. Nu = nucleolus. FC = nucleolus febrile center. Ch = electron-dense chromatin. N = nuclei. C = cytoplasm. Bar = 0.2 μ m. doi:10.1371/journal.pone.0109521.g003

proteins involved in RNA export, our previous work [22] identified a RNA DEAD-box helicase protein named Hel45. We have considered that Hel45 is conserved across eukaryotes and has similarity to shuttling RNA helicases from mammalian and yeast,

like DBP5/DDX19 [45] and eiF4AIII [46,47]. Then, we decided to investigate the role of Hel45 in mRNA nucleocytoplasmic transport in *Trypanosoma cruzi*.

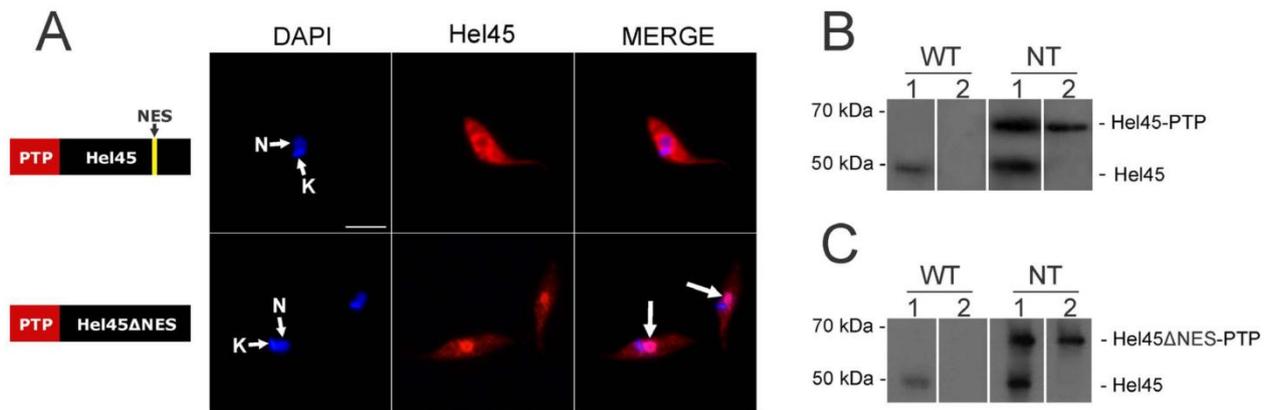


Figure 4. Cellular localization of tagged Hel45 in *Trypanosoma cruzi*. (A) Detection of exogenous Hel45 and a Hel45 NES deletion mutant (Hel45 Δ NES) (both tagged with PTP at the NT) by indirect immunofluorescence microscopy with an anti-ProtA antibody. DAPI = DNA stained with DAPI. Hel45 = localization of tagged Hel45 or Hel45 Δ NES. MERGE = merged images for DAPI staining and Hel45 localization. N = nucleus. K = kinetoplast. Arrows = parasites with nuclear accumulation of tagged Hel45. Bar = 5 μ m. (B and C) Western blot of total extract from wild-type epimastigotes (WT) and epimastigotes expressing recombinant Hel45 (B) or Hel45 Δ NES (C) tagged with a PTP at the N-terminus (NT). Lane 1 = detection with anti-Hel45 antibodies. Lane 2 = detection with anti-ProtA antibodies. doi:10.1371/journal.pone.0109521.g004

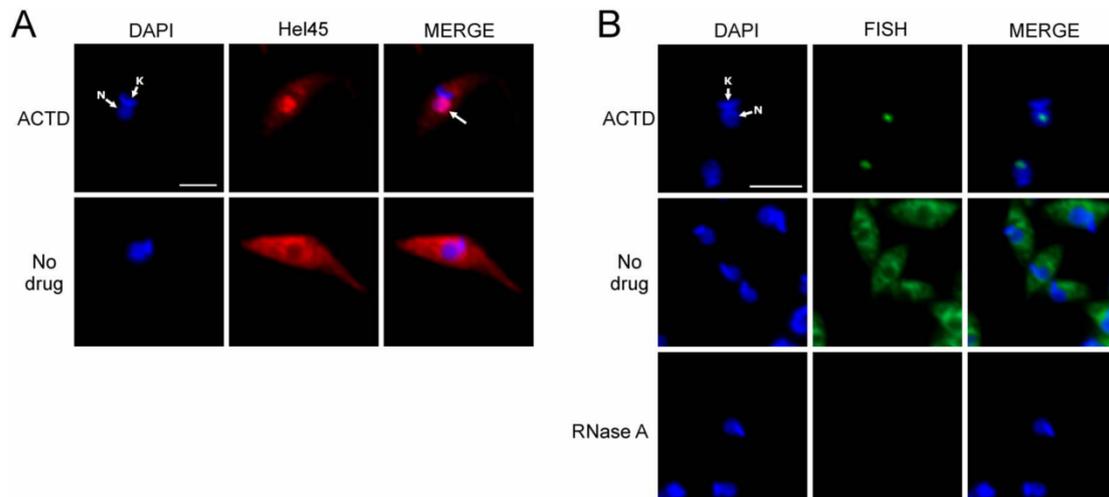


Figure 5. Localization of Hel45 after actinomycin D treatment in *T. cruzi*. Detection of exogenous Hel45 (A) tagged with PTP at the NT by indirect immunofluorescence with an anti-ProtA antibody and of mRNA (B) by fluorescence *in situ* hybridization (FISH) with a digoxigenin-conjugated oligo(dT) probe in *T. cruzi* after treatment with 50 $\mu\text{g/ml}$ actinomycin D (ACTD) for 24 hours. Probe detection was carried out by indirect immunofluorescence with anti-DIG mouse monoclonal antibodies (Sigma-Aldrich, 1:300 dilution) followed by secondary Alexa Fluor 488-conjugated antibodies (1:600 dilution). As a control, 100 $\mu\text{g/ml}$ RNase A was incubated with the parasites before probe hybridization (RNase A). DAPI = DNA stained with DAPI. Hel45 = localization of tagged Hel45. MERGE = merged images for DAPI staining and Hel45 or mRNA localization. N = nucleus. K = kinetoplast. Arrows = parasites with nuclear accumulation of tagged Hel45. Bar = 5 μm . doi:10.1371/journal.pone.0109521.g005

RNA helicases of the DEAD/H-box family are characterized by the presence of nine conserved motifs that are incorporated into two RecA-like domains. These helicases are involved in several biological steps in RNA metabolism, from transcription to translation [44]. We demonstrate that these nine motifs are conserved in Hel45 and are clustered into the two domains typical of DEAD-box helicases (Figures 1B and 1C). These findings suggest that Hel45 belongs to the RNA helicase family. Comparative analyses of protein sequences from members of eIF4A family and other RNA helicases involved in mRNA metabolism have shown that Hel45 is more similar to eIF4AIII (Figure 1A, Table S1). In metazoan, eIF4AIII is a nuclear protein [54] that associates to mRNA during splicing at region containing the Exon Junction Complex (EJC) and shuttles to the cytoplasm probably to function during Non-sense Mediated Decay (NMD) pathway [46]. However, in trypanosomes no orthologue of eIF4AIII was identified yet as component of EJC core and the role of EJC in trans-splicing remain unclear [55]. Furthermore, it is not clear that a classical NMD exist in trypanosomes [56]. Further investigation is necessary to identify proteins associated to Hel45 before speculating a functional correlation with metazoan eIF4AIII.

Hel45 is present in both cytoplasm and nucleus (Figure 3), and deletion of the predicted NES motif in the CT region resulted in the accumulation of the protein in the nucleus (Figure 4A). These observations confirm that the NES-containing Hel45 is a shuttle protein. The transport of NES-containing cargo is usually mediated by exportins, which interact with domains of inner nucleoporins [57] to mediate transient docking at the NPC [21]. Comparative genomic analysis has shown that Crm1 is the most conserved exportin in diverse organisms [22]. Furthermore, the *T. cruzi* Crm1 contains the CRIME domain, which interacts with RanGTP, and the CCR domain, which is a target of leptomycin B [58]. Surprisingly, we demonstrated that Hel45 nuclear export was not blocked by sustained treatment with leptomycin B (Figure 6A). This indicates that Crm1 is not the receptor involved in

transporting Hel45 through the NPC, suggesting that NES is not recognized by Crm1. The NES is essential for Hel45 shuttling, but it may not be the only signal. Indeed, deletion did not result in the complete retention of Hel45 in the nucleus, and some was still present in the cytoplasm (Figure 4A). RNA-binding motifs have also been reported to mediate the nuclear transport of proteins in *T. cruzi* [59]. Therefore we cannot rule out the possibility that the RNA-binding motifs of Hel45 (Figure 1) are also important for transport. Interestingly, only a small number of shuttle proteins have been identified in trypanosomatids and only two RNA-binding proteins identified thus far have NES motifs [7,60].

Our data indicate that Hel45 is localized at the periphery of dense chromatin domains (Figure 3C.1) called interchromatin granule clusters (IGCs) [39], thought to correspond to regions of active transcription and splicing. Many studies have shown that nascent mRNAs move into these interchromatin spaces [61,62]. It is likely that an interaction with mRNA is also essential for Hel45 shuttling because Hel45 accumulated in the nucleus when transcription was blocked by actinomycin D (Figure 5). Therefore, Hel45 appears to interact with mRNA during transcription and is transported through the NPC by a specific receptor.

Exportin activity is dependent on RanGTP and, apart from Crm1, other exportins are not conserved in *T. cruzi* [22]. Treatment with leptomycin B did not block the shuttling of Hel45; therefore, Hel45 may be exported by a RanGTP-independent pathway. Mex67 functions as the receptor for a RanGTP-independent mRNA export pathway in several eukaryotic species. This receptor also mediates mRNA export in *T. brucei*, because knockdown of Mex67 expression leads to accumulation of mRNA in the nucleus [51,52]. We found that knockdown of Mex67 in *T. brucei* caused an accumulation of the *T. brucei* ortholog of Hel45 in the nucleus (Figure 6E.1). This suggests that Hel45 shuttling is dependent on the Mex67 pathway in trypanosomes.

Even if the molecular modeling has shown structural similarity with members of eIF4A family, Hel45 does not seem to function as a translational factor, because the inhibition of translation did not

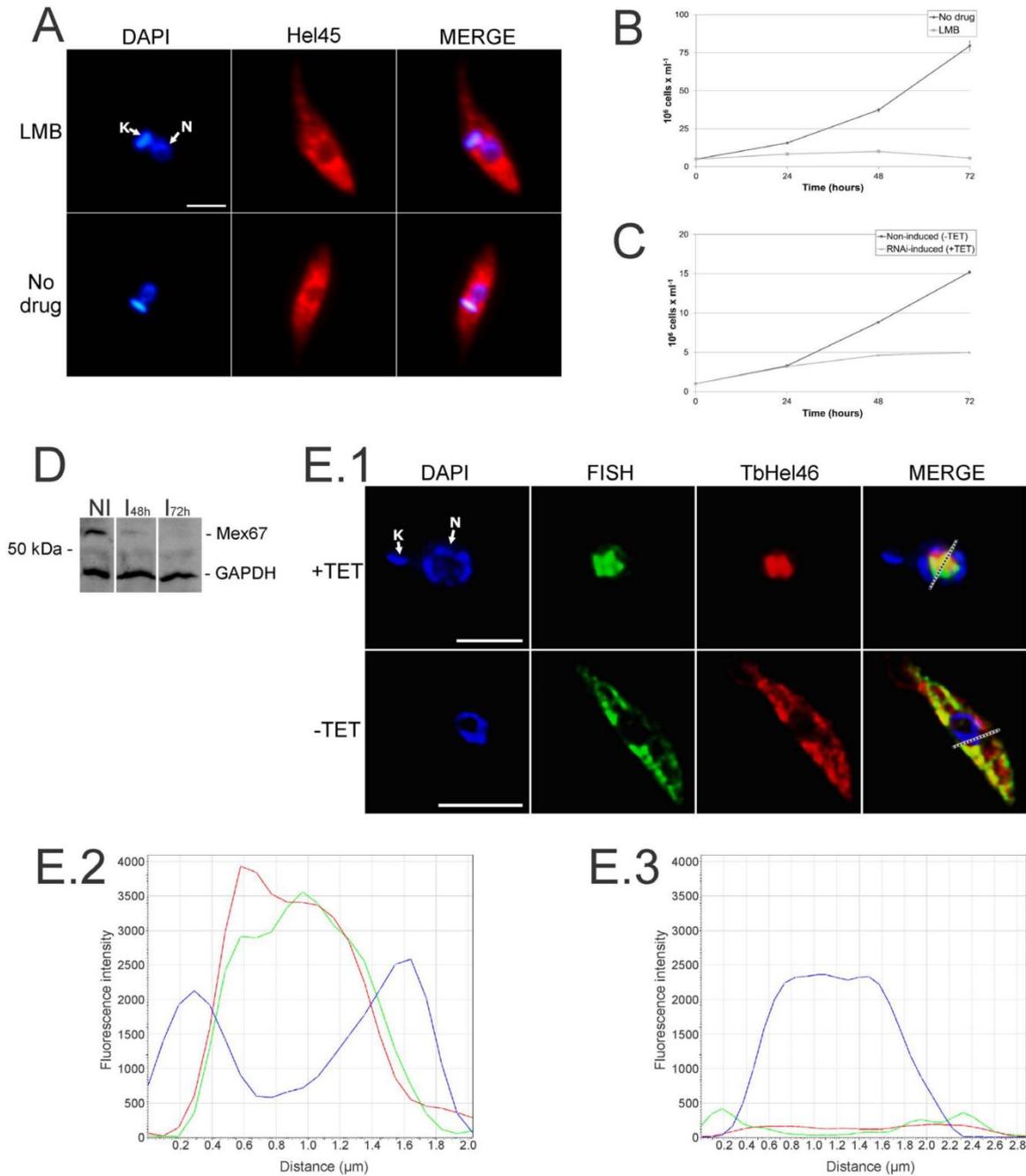


Figure 6. Localization of Hel45 after leptomycin B treatment in *T. cruzi* and localization of the ortholog of Hel45 (TbHel46) in *T. brucei* after Mex67 RNAi induction. (A) Detection of exogenous Hel45 tagged with PTP at the NT by indirect immunofluorescence with an anti-ProtA antibody. *T. cruzi* parasites were treated with 500 ng/ml leptomycin B (LMB) for 24 hours or were untreated (control). (B) Growth curve of *T. cruzi* parasites after treatment with 500 ng/ml leptomycin B (LMB). (C) Growth curve of *T. brucei* parasites after the induction of RNAi against Mex67 with 2 µg/ml tetracycline (RNAi-induced). (B) and (C) represent graphics of a biological replica which the density of cells in the culture was determined by counting in triplicate with a particle counter (Beckman Coulter). (D) Western-blot analysis of total protein extracts from parasites 48 (I_{48h}) or 72 (I_{72h}) hours after the induction of Mex67 RNAi. Non-induced (NI) parasites are shown as a control. The assay was carried out with anti-Mex67 antibodies. Anti-GAPDH antibodies were used as loading control. (E.1) Cellular localization of mRNA by fluorescence *in situ* hybridization (FISH) with a digoxigenin-conjugated oligo(dT) probe and localization of TbHel46 by indirect immunofluorescence. Cells were fixed 48 hours after the induction of Mex67 RNAi (+TET). Images were processed by deconvolution software Leica AF6000. DAPI = DNA stained with DAPI. Hel45 = localization of tagged Hel45. TbHel46 = endogenous TbHel46 localized with anti-Hel45 antibodies. MERGE = merged images for DAPI staining and Hel45 localization (A) or DAPI staining, FISH and TbHel46 localization (E.1). N = nucleus. K = kinetoplast. (E.2 and E.3) Graphs show the quantification of fluorescence intensity of DAPI (blue), FISH (green), and TbHel46 (red) labelling that was detected across the dotted line in E.1. Fluorescence intensity was plotted in the y-axis for Mex67 RNAi-induced parasites (+TET, Figure E.2) and non-induced parasites (-TET, Figure E.3). doi:10.1371/journal.pone.0109521.g006

change the sedimentation profile of Hel45 on sucrose density gradients (Figure 2B). Instead, the sedimentation profile of Hel45 was affected by the treatment of the protein extract with a nuclease (Figure 2C). In addition, Hel45 was present in mRNPs not associated with polysomes (Figure 2D). These results are consistent with previous findings that identified Hel45 as a component of polysome-independent mRNP complexes [43]. Based on these findings, we suggest that Hel45 also interacts with mRNA in the cytoplasm and it is not associated with polysomes. Besides, members of eIF4A family have been shown to possess rather diverse roles in the mRNA lifecycle, although they are highly similar. Their specific and diverse functions are often regulated and dictated by interacting partner proteins [63].

Taking together, our findings suggest that the nucleocytoplasmic shuttling of Hel45 is dependent on a Mex67 mRNA export pathway. However, additional studies are required to assess the precise function of Hel45 in mRNA metabolism. Previous work, indicate that components of the mRNA export pathway in parasites, such as Mex67 [51,52], present distinct features. This means that the function of specific components needs to be dissected within the context of these particular organisms. Lastly, most factors that play a role in post-transcriptional regulation in parasites are cytoplasmic proteins; therefore, we believe that the identification of nucleocytoplasmic shuttling proteins will improve the knowledge of the factors involved in post-transcriptional regulation of gene expression in parasites.

Supporting Information

Figure S1 Deletion of the predicted NES of the Hel45 gene. Alignment of the Hel45 gene and Hel45 Δ NES sequences, obtained with Clustal W2 software. Hel45 Δ NES was sequenced and the deletion of NES was confirmed. (N) Nucleotide sequence. (AA) Deduced amino-acid sequence translated from the nucleotide sequence. Asterisks (*) indicate consensus nucleotide sequence. NES = nuclear export sequence. (TIF)

Figure S2 Localization of polyadenylated mRNA after induction of RNAi against Mex67 in *T. brucei*. Cellular localization of mRNA with a digoxigenin-conjugated oligo(dT) probe, by fluorescence *in situ* hybridization (FISH). The probe was detected by indirect immunofluorescence assays with a mouse anti-digoxigenin monoclonal antibody (Sigma-Aldrich, 1:300 dilution) followed by a secondary Alexa Fluor 488-conjugated antibody. As a control, 100 μ g/ml RNase A was incubated with the parasites before probe hybridization (RNase A). DAPI = DNA stained with DAPI. MERGE = merged images for DAPI staining and FISH. N = nucleus. K = kinetoplast. Bar = 5 μ m.

References

- Rassi A, Marin-Neto JA (2010) Chagas disease. *Lancet* 375: 1388–1402.
- Vanhamme L, Pays E (1995) Control of gene expression in trypanosomes. *Microbiol Rev* 59: 223–240.
- Kolev NG, Franklin JB, Carmi S, Shi H, Michaeli S, et al. (2010) The transcriptome of the human pathogen *Trypanosoma brucei* at single-nucleotide resolution. *PLoS Pathog* 6: e1001090.
- Liang XH, Haritan A, Uliel S, Michaeli S (2003) trans and cis splicing in trypanosomatids: mechanism, factors and regulation. *Eukaryot Cell* 2: 830–840.
- Matthews KR, Tschudi C, Ullu E (1994) A common pyrimidine-rich motif governs trans-splicing and polyadenylation of tubulin polycistronic pre-mRNA in trypanosomes. *Genes Dev* 8: 491–501.
- LeBowitz JH, Smith HQ, Rusche L, Beverley SM (1993) Coupling of poly(A) site selection and trans-splicing in *Leishmania*. *Genes Dev* 7: 996–1007.
- D'Orso I, Frasch ACC (2001) TcUBP-1, a developmentally regulated U-rich RNA-binding protein involved in selective mRNA destabilization in trypanosomes. *J Biol Chem* 276: 34801–34809.
- D'Orso I, Gaudenzi JG De, Frasch ACC (2003) RNA-binding proteins and mRNA turnover in trypanosomes. *Trends in Parasitology* 19: 151–155.
- Dallagiovanna B, Correa A, Probst CM, Holetz F, Smircich P, et al. (2008) Functional Genomic Characterization of mRNAs Associated with TcPUF6, a Pumilio-like Protein from *Trypanosoma cruzi*. *J Biol Chem* 283: 8266–8273.
- Rout MP, Aitchison JD, Suprpto A, Hjertaas K, Zhao Y, et al. (2000) The yeast nuclear pore complex: composition, architecture and transport mechanism. *J Cell Biol* 148: 635–651.
- Strambio-De-Castillia C, Niepel M, Rout MP (2010) The nuclear pore complex: bridging nuclear transport and gene regulation. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11: 490–501.
- Ström A-C, Weis K (2001) Importin- β -like nuclear transport receptors. *Genome Biol* 2: reviews3008.1–3008.9.
- Hutten S, Kehlenbach RH (2007) CRM1-mediated nuclear export: to the pore and beyond. *Trends Cell Biol* 17: 193–201.
- Fornerod M, Ohno M, Yoshida M, Mattaj IW (1997) CRM1 Is an Export Receptor for Leucine-Rich. *Cell* 90: 1051–1060.

(TIF)

Figure S3 Localization of TbHel46 after the induction of RNAi against Mex67 in *T. brucei*. Detection of TbHel46 by indirect immunofluorescence with an anti-Hel45 antibody in cells 48 hours after the induction of RNAi against Mex67 (TET). DAPI = DNA stained with DAPI. TbHel46 = endogenous TbHel46 localized with anti-Hel45 antibodies. MERGE = merged images for DAPI staining and TbHel46 localization. N = nucleus. K = kinetoplast. Arrows = parasites with nuclear accumulation of TbHel46. Bar = 5 μ m.

(TIF)

Table S1 Similarity of Hel45 with other eukaryotic RNA helicases. Percentage of similarity (upper diagonal) and identity (lower diagonal) among proteins of the DEAD-box helicase family belonging to representative species of different eukaryotic groups. Hel45 is shown as Tcr_Tc00.1047053506587.40_71418343 and the other sequences are named accordingly: organism abbreviation, gene name and GenBank Identifier (GI) delimited by underscores. The organism abbreviations are: Sce: *Saccharomyces cerevisiae* (Fungi), Hsa: *Homo sapiens* (Metazoa), Ddi: *Dictyostelium discoideum* (Amoebozoa), Ath: *Arabidopsis thaliana* (Plantae), Pfa: *Plasmodium falciparum* (Chromalveolata), Tgo: *Toxoplasma gondii* (Chromalveolata), Tcr: *Trypanosoma cruzi* (Excavata), Tbr: *Trypanosoma brucei* (Excavata), Lma: *Leishmania major* (Excavata).

(XLS)

Acknowledgments

We thank Nilson Fidêncio and Vanessa M. dos Santos for technical assistance, Alejandro Correa for valuable comments, Michel Batista for providing the vectors for localization experiments and Szu-Chin Fu for NES prediction with the NESsential program. We would like to thank the following persons for providing some of the antibodies used in this study: Gisele Fernanda Assine Picchi (anti-H2A), Flávia S. Pereira de Souza (anti-GAPDH). The authors also thank the Program for Technological Development in Tools for Health-PDTIS-FIOCRUZ for the use of its facilities (RPT07C, microscopy facility at the Carlos Chagas Institute/Fiocruz-PR, Brazil).

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: AHI JRCM MCMM SG ARA. Performed the experiments: AHI MS PMH SFYO JRCM MCMM NMV. Analyzed the data: AHI JRCM MCMM NMV SG ARA. Contributed reagents/materials/analysis tools: SFYO JRCM MCMM NMV SG ARA. Contributed to the writing of the manuscript: AHI SG ARA. Provided guidance, direction, decision-making, and oversight: AHI SG ARA.

15. Dong X, Biswas A, Stiel KE, Jackson LK, Martinez R, et al. (2012) Structural basis for leucine-rich nuclear export signal recognition by CRM1. *Nature* 458: 1136–1141.
16. Neville M, Rosbash M (1999) The NES-Crm1p export pathway is not a major mRNA export route in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J* 18: 3746–3756.
17. Brennan CM, Gallouzi IE, Steitz J a (2000) Protein ligands to HuR modulate its interaction with target mRNAs in vivo. *J Cell Biol* 151: 1–14.
18. Watanabe M, Fukuda M, Yoshida M, Yanagida M, Nishida E (1999) Involvement of CRM1, a nuclear export receptor, in mRNA export in mammalian cells and fission yeast. *Genes Cells* 4: 291–297.
19. Herold A, Teixeira L, Izaurrealde E (2003) Genome-wide analysis of nuclear mRNA export pathways in *Drosophila*. *EMBO J* 22: 2472–2483.
20. Lund MK, Guthrie C (2005) The DEAD-box protein Dbp5p is required to dissociate Mex67p from exported mRNPs at the nuclear rim. *Mol Cell* 20: 645–651.
21. Köhler A, Hurt E (2007) Exporting RNA from the nucleus to the cytoplasm. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8: 761–773.
22. Serpeloni M, Vidal NM, Goldenberg S, Ávila AR, Hoffmann FG (2011) Comparative genomics of proteins involved in RNA nucleocytoplasmic export. *BMC Evol Biol* 11: 7.
23. Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, et al. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 25: 3389–3402.
24. Tatusova T, Ciufo S, Fedorov B, O'Neill K, Tolstoy I (2014) RefSeq microbial genomes database: new representation and annotation strategy. *Nucleic Acids Res* 42: D553–D559.
25. Edgar RC (2004) MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res* 32: 1792–1797.
26. Rice P, Longden I, Bleasby A (2000) EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite. *Trends Genet* 16: 276–277.
27. Westbrook J, Feng Z, Jain S, Bhat TN, Thanki N, et al. (2002) The Protein Data Bank: unifying the archive. *Nucleic Acids Res* 30: 245–248.
28. McGuffin LJ, Jones DT (2003) Improvement of the GenTHREADER method for genomic fold recognition. *Bioinformatics* 19: 874–881.
29. Sali A, Blundell T (1993) Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints. *J Mol Biol* 234: 779–815.
30. Fu S, Imai K, Horton P (2011) Prediction of leucine-rich nuclear export signal containing proteins with NESntial. *Nucleic Acids Res* 39: 1–12.
31. Contreras VT, Araujo-Jorge TC, Bonaldo MC, Thomaz N, Barbosa HS, et al. (1988) Biological aspects of the Dm 28c clone of *Trypanosoma cruzi* after metacyclogenesis in chemically defined media. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 83: 123–133.
32. Wirtz E, Leal S, Ochatt C, Cross G (1999) A tightly regulated inducible expression system for conditional gene knock-outs and dominant-negative genetics in *Trypanosoma brucei*. *Mol Biochem Parasitol* 99: 89–101.
33. De Souza FSP, Rampazzo RDC, Manhaes L, Soares MJ, Cavalcanti DP, et al. (2010) Knockout of the gene encoding the kinetoplast-associated protein 3 (KAP3) in *Trypanosoma cruzi*: effect on kinetoplast organization, cell proliferation and differentiation. *Mol Biochem Parasitol* 172: 90–98.
34. Dallagiovanna B, Plazanet-Menut C, Ogatta S, Ávila A, Krieger M, et al. (2001) *Trypanosoma cruzi*: a gene family encoding chitin-binding-like proteins is posttranscriptionally regulated during metacyclogenesis. *Exp Parasitol* 99: 7–16.
35. Roberts TG, Sturm NR, Yee BK, Yu MC, Hartshorne T, et al. (1998) Three small nucleolar RNAs identified from the spliced leader-associated RNA locus in kinetoplastid protozoans. *Mol Cell Biol* 18: 4409–4417.
36. Batista M, Marchini FK, Celedon PAF, Fragoso SP, Probst CM, et al. (2010) A high-throughput cloning system for reverse genetics in *Trypanosoma cruzi*. *BMC Microbiol* 10: 259.
37. Schimanski B, Nguyen TN, Gu A (2005) Highly efficient tandem affinity purification of trypanosome protein complexes based on a novel epitope combination. *Eukaryot Cell* 4: 1942–1950.
38. Lu HY, Buck GA (1991) Expression of an exogenous gene in *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. *Mol Biochem Parasitol* 44: 109–114.
39. Serpeloni M, Moraes CB, Muniz JRC, Motta MCM, Ramos ASP, et al. (2011) An essential nuclear protein in trypanosomes is a component of mRNA transcription/export pathway. *PLoS One* 6: e20730.
40. Motta MC, De Souza W, Thiry M (2003) Immunocytochemical detection of DNA and RNA in endosymbiont-bearing trypanosomatids. *FEMS Microbiol Lett* 221: 17–23.
41. Redmond S, Vadelu J, Field MC (2003) RNAi: an automated web-based tool for the selection of RNAi targets in *Trypanosoma brucei*. *Mol Biochem Parasitol* 128: 115–118.
42. Wickstead B, Ersfeld K, Gull K (2002) Targeting of a tetracycline-inducible expression system to the transcriptionally silent minichromosomes of *Trypanosoma brucei*. *Mol Biochem Parasitol* 125: 211–216.
43. Alves LR, Ávila AR, Correa A, Holetz FB, Mansur FCB, et al. (2010) Proteomic analysis reveals the dynamic association of proteins with translated mRNAs in *Trypanosoma cruzi*. *Gene* 452: 72–78.
44. Cordin O, Banroques J, Tanner NK, Linder P (2006) The DEAD-box protein family of RNA helicases. *Gene* 367: 17–37.
45. Hodge CA, Colot H V, Stafford P, Cole CN (1999) Rat8p/Dbp5p is a shuttling transport factor that interacts with Rat7p/Nup159p and Gle1p and suppresses the mRNA export defect of xpo1-1 cells. *EMBO J* 18: 5778–5788.
46. Ferraiuolo M A, Lee C-S, Ler LW, Hsu JL, Costa-Mattioli M, et al. (2004) A nuclear translation-like factor eIF4AIII is recruited to the mRNA during splicing and functions in nonsense-mediated decay. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 4118–4123.
47. Maquat LE (2005) Nonsense-mediated mRNA decay in mammals. *J Cell Sci* 118: 1773–1776.
48. Názer E, Verdún RE, Sánchez DO (2011) Nucleolar Localization of RNA Binding Proteins Induced by Actinomycin D and Heat Shock in *Trypanosoma cruzi*. *PLoS One* 6: e19920.
49. Fukuda M, Asano S, Nakamura T, Adachi M, Yoshida M, et al. (1997) CRM1 is responsible for intracellular transport mediated by the nuclear export signal. *Nature* 390: 308–311.
50. Ossareh-Nazari B, Bachelier F, Dargemont C (1997) Evidence for a Role of CRM1 in Signal-Mediated Nuclear Protein Export. *Science* 278: 141–144.
51. Dostalova A, Käser S, Cristodero M, Schimanski B (2013) The nuclear mRNA export receptor Mex67-Mtr2 of *Trypanosoma brucei* contains a unique and essential zinc finger motif. *Mol Microbiol* 88: 728–739.
52. Schwede A, Manful T, Jha BA, Helbig C, Bercovich N, et al. (2009) The role of deadenylation in the degradation of unstable mRNAs in trypanosomes. *Nucleic Acids Res* 37: 5511–5528.
53. DaRocha WD, Otsu K, Teixeira SMR, Donelson JE (2004) Tests of cytoplasmic RNA interference (RNAi) and construction of a tetracycline-inducible T7 promoter system in *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol* 133: 175–186.
54. Chan CC, Dostie J, Diem MD, Feng W, Mann M, et al. (2004) eIF4A3 is a novel component of the exon junction complex. *RNA* 10: 200–209.
55. Bercovich N, Levin MJ, Clayton C, Vazquez MP (2009) Identification of core components of the exon junction complex in trypanosomes. *Mol Biochem Parasitol* 166: 190–193.
56. Delhi P, Queiroz R, Inchaustegui D, Carrington M, Clayton C (2011) Is there a classical nonsense-mediated decay pathway in trypanosomes? *PLoS One* 6: e25112.
57. Patel SS, Belmont BJ, Sante JM, Rexach MF (2007) Natively unfolded nucleoporins gate protein diffusion across the nuclear pore complex. *Cell* 129: 83–96.
58. Cuevas IC, Frasch ACC, D'Orso I (2005) Insights into a CRM1-mediated RNA-nuclear export pathway in *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol* 139: 15–24.
59. Cassola A, Frasch AC (2009) An RNA recognition motif mediates the nucleocytoplasmic transport of a trypanosome RNA-binding protein. *J Biol Chem* 284: 35015–35028.
60. Hellman K, Prohaska K, Williams N (2007) *Trypanosoma brucei* RNA binding proteins p34 and p37 mediate NOPP44/46 cellular localization via the exportin 1 nuclear export pathway. *Eukaryot Cell* 6: 2206–2213.
61. Siebrasse JP, Kaminski T, Kubitschek U (2012) Nuclear export of single native mRNA molecules observed by light sheet fluorescence microscopy. *Proc Natl Acad Sci USA* 2012: 1–6.
62. Mor A, Suliman S, Ben-Yishay R, Yunger S, Brody Y, et al. (2010) Dynamics of single mRNP nucleocytoplasmic transport and export through the nuclear pore in living cells. *Nat Cell Biol* 12: 543–552.
63. Lu W-T, Wilczynska A, Smith E, Bushell M (2014) The diverse roles of the eIF4A family: you are the company you keep. *Biochem Soc Trans* 42: 166–172.

```

Hel45 | N 741-AAATTTGAAACTCTCTGCGACCTCTACGACACCCTAACCATCGCCCATGCCGTTATCTTCTGT-804
      | AA  K F E T L C D L Y D T L T I A H A V I F C
Hel45ΔNES | N  AAATTTGAAACTCTCTGCGAC-----GCCCATGCCGTTATCTTCTGT
          | AA  K F E T L C D A H A V I F C
Consensus | *****

```

NES deleted

Figure S1. Deletion of the predicted NES of the Hel45 gene. Alignment of the Hel45 gene and Hel45ΔNES sequences, obtained with Clustal W2 software. Hel45ΔNES was sequenced and the deletion of NES was confirmed. (N) Nucleotide sequence. (AA) Deduced amino-acid sequence translated from the nucleotide sequence. Asterisks (*) indicate consensus nucleotide sequence. NES = nuclear export sequence.

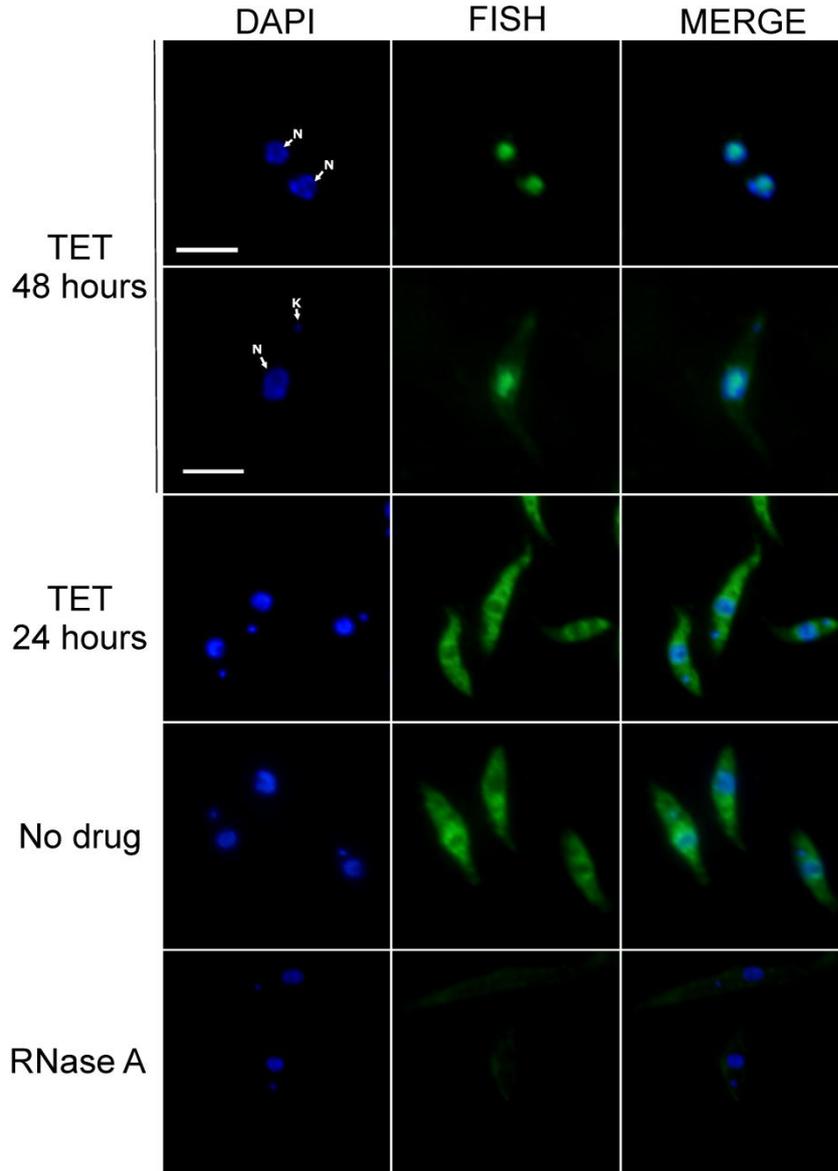


Figure S2. Localization of polyadenylated mRNA after induction of RNAi against Mex67 in *T. brucei*. Cellular localization of mRNA with a digoxigenin-conjugated oligo(dT) probe, by fluorescence *in situ* hybridization (FISH). The probe was detected by indirect immunofluorescence assays with a mouse anti-digoxigenin monoclonal antibody (Sigma-Aldrich, 1:300 dilution) followed by a secondary Alexa Fluor 488-conjugated antibody. As a control, 100 µg/ml RNase A was incubated with the parasites before probe hybridization (RNase A). DAPI = DNA stained with DAPI. MERGE = merged images for DAPI staining and FISH. N = nucleus. K = kinetoplast. Bar = 5 µm.

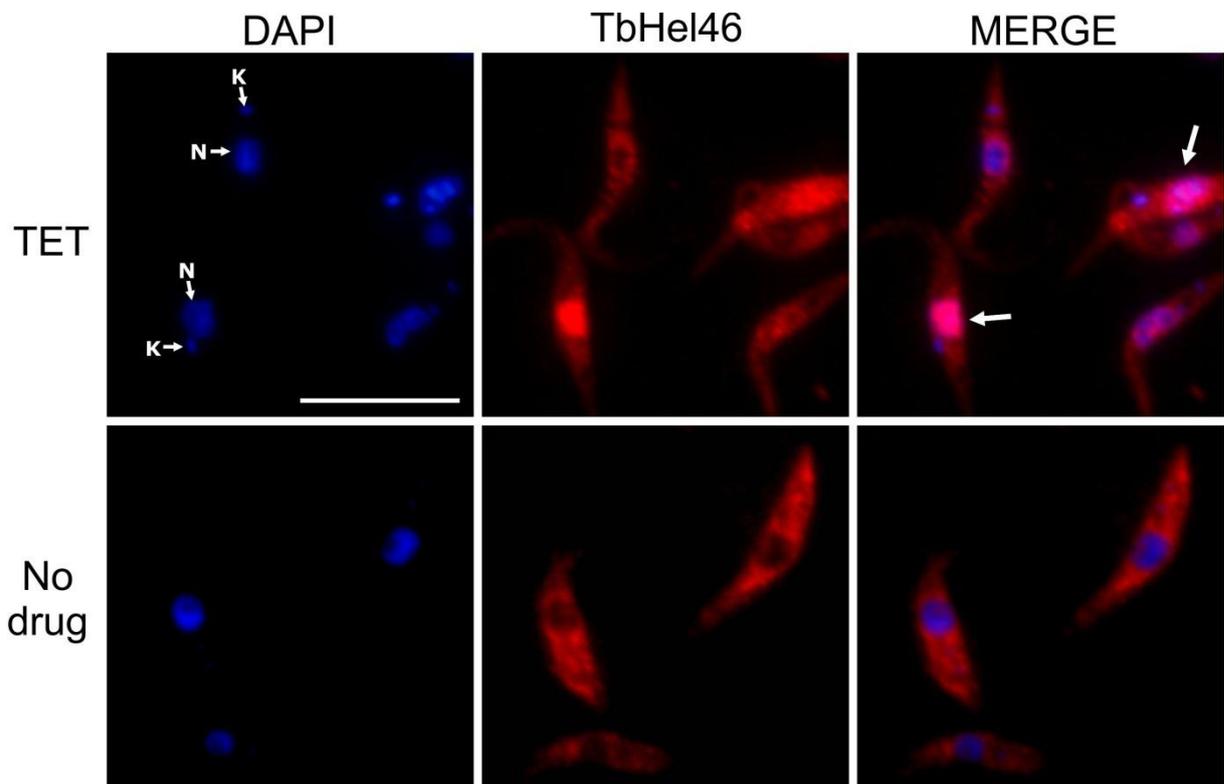


Figure S3. Localization of TbHel46 after the induction of RNAi against Mex67 in *T. brucei*. Detection of TbHel46 by indirect immunofluorescence with an anti-*Hel45* antibody in cells 48 hours after the induction of RNAi against Mex67 (TET). DAPI = DNA stained with DAPI. TbHel46 = endogenous TbHel46 localized with anti-*Hel45* antibodies. MERGE = merged images for DAPI staining and TbHel46 localization. N = nucleus. K = kinetoplast. Arrows = parasites with nuclear accumulation of TbHel46. Bar = 5 μ m.

	Scce_DBP5_6324620	Hsa_DDX19B_6005743	Hsa_DDX19A_8922886	Hsa_DDX25_164419732	Ddi_helC_66812908	Ath_LOS4_15231748	Pfal_PF14_0563_124810005	Tgo_TGME49_020860_237841277	Scce_FAL1_398365053	Hsa{EIF4A3_7661920	Ddi_tifA_66825831	Ath_AT1G51380_15223841	Ath{EIF4A-III_15230945	Pfa_PFD1070w_124505577	Tgo_TGME49_056770_237831253	Tcr_Tc00.1047053506587.40_71418343	Tbr_Tb11.12.0011_71756053	Lma_LMJF_28_1530_157871774	Scce_TIF2_6322323	Hsa{EIF4A1_4503529	Hsa{EIF4A2_83700235	Ddi_ifdA_66825125	Ath{EIF4A1_79313227	Ath{EIF4A-2_15221761	Ath_AT1G72730_15218574	Pfa_H45_124810293	Tgo_TGME49_050770_237836123	Tcr_Tc00.1047053510155.180_71666325	Tbr_Tb09.160.3270_71744488	Lma_LMJF_01_0770_389592463
Scce_DBP5_6324620	XX	74.1	74.1	71.8	73.1	66.6	62.4	55.2	63.2	63.4	61.0	63.5	62.8	58.4	60.2	60.3	61.0	61.4	64.0	63.2	63.2	62.7	61.5	61.5	62.2	64.2	60.8	62.4	61.8	62.0
Hsa_DDX19B_6005743	51.0	XX	100.0	87.1	70.5	63.3	59.5	54.6	62.9	62.2	62.4	60.6	62.6	58.2	61.0	60.8	60.6	60.0	64.6	63.2	63.5	62.2	60.5	60.7	60.5	60.1	60.5	63.0	62.7	60.6
Hsa_DDX19A_8922886	51.3	98.6	XX	87.4	70.5	63.6	59.7	54.9	62.9	62.2	62.7	60.2	62.3	58.4	61.0	60.8	60.9	60.0	64.8	63.2	63.5	62.2	60.5	60.7	60.5	59.9	60.8	62.7	62.5	60.3
Hsa_DDX25_164419732	51.3	72.6	73.1	XX	68.5	64.3	59.0	53.8	61.9	62.8	61.5	59.7	61.8	58.4	60.7	61.2	60.6	59.2	62.6	60.0	60.0	61.4	59.9	59.3	59.9	61.9	61.3	59.2	59.1	58.1
Ddi_helC_66812908	50.7	49.1	49.4	47.2	XX	63.4	60.6	52.6	61.1	63.5	63.6	60.8	62.3	58.1	62.3	61.4	62.2	62.2	64.4	63.2	63.4	63.6	61.1	61.1	61.9	61.9	61.1	63.2	63.2	63.4
Ath_LOS4_15231748	41.8	40.8	41.7	42.4	40.6	XX	56.3	51.2	59.2	57.5	56.1	56.6	58.1	55.6	58.3	56.7	57.8	56.7	57.4	58.0	59.0	58.4	57.3	56.5	58.4	55.8	56.7	54.3	54.7	55.4
Pfal_PF14_0563_124810005	39.7	39.7	39.7	39.7	34.7	33.4	XX	58.2	56.9	56.4	55.8	54.6	55.1	53.2	53.6	52.7	52.2	50.6	57.2	53.3	54.0	55.8	54.1	53.3	53.6	55.2	55.4	56.1	56.1	54.4
Tgo_TGME49_020860_237841277	35.2	37.6	37.2	36.7	34.2	34.5	42.2	XX	49.7	48.3	51.1	47.7	48.6	47.0	48.0	47.3	46.6	46.8	50.0	50.8	50.3	50.9	48.5	49.0	49.0	48.3	48.0	49.2	49.3	48.4
Scce_FAL1_398365053	38.8	41.9	41.6	39.5	39.4	35.8	37.1	32.3	XX	83.8	81.4	79.1	81.2	76.2	79.1	76.8	77.4	76.8	75.9	78.6	79.4	75.9	76.5	75.9	76.5	75.4	77.1	75.1	74.5	76.4
Hsa{EIF4A3_7661920	41.2	38.7	38.9	39.4	39.1	34.7	33.6	31.9	64.3	XX	87.7	84.8	91.2	82.2	88.0	80.7	80.7	80.7	83.6	85.1	86.0	81.6	82.7	82.5	81.9	82.2	82.7	77.7	77.2	79.1
Ddi_tifA_66825831	42.7	43.2	43.5	41.3	40.6	36.7	35.9	33.6	63.8	72.8	XX	81.3	84.2	81.6	84.5	79.5	79.2	78.9	81.9	83.1	82.2	81.6	81.0	80.1	80.4	80.7	81.9	75.1	74.9	75.7
Ath_AT1G51380_15223841	41.1	39.4	40.1	38.3	38.1	33.7	31.0	31.8	59.1	68.7	62.9	XX	90.4	77.2	79.8	76.9	75.1	76.0	76.9	78.4	78.7	75.7	77.5	77.2	77.2	77.5	77.7	73.7	73.4	75.4
Ath{EIF4A-III_15230945	40.3	39.7	40.2	38.2	39.1	35.8	33.6	33.6	62.9	78.4	69.3	78.7	XX	80.1	85.4	81.0	80.1	80.7	81.3	81.9	82.8	82.2	82.2	81.3	80.7	81.3	77.5	77.2	78.8	
Pfa_PFD1070w_124505577	37.0	36.4	36.5	36.8	37.1	35.1	34.5	32.5	55.1	66.1	62.9	58.5	62.6	XX	86.0	76.0	76.3	74.9	76.0	78.1	78.1	76.2	76.0	75.1	75.1	78.1	78.9	72.3	72.3	74.2
Tgo_TGME49_056770_237831253	40.3	40.4	40.7	39.6	38.5	36.1	33.9	32.7	62.0	77.8	68.1	62.9	72.5	69.9	XX	80.1	80.1	79.2	79.2	80.2	81.0	79.2	78.9	78.1	77.5	78.9	79.2	75.4	74.6	75.7
Tcr_Tc00.1047053506587.40_71418343	38.0	41.4	41.4	37.6	38.4	34.2	31.5	31.9	55.4	62.0	59.6	59.1	64.0	55.8	63.7	XX	97.4	91.8	75.4	76.1	77.0	74.3	77.5	76.6	76.3	76.3	76.0	75.4	74.6	75.7
Tbr_Tb11.12.0011_71756053	38.7	41.4	41.6	37.1	37.8	34.8	32.6	32.3	55.9	60.8	59.4	58.5	63.2	55.3	62.9	92.7	XX	92.4	75.4	76.1	77.3	74.3	77.5	76.3	76.0	75.4	76.3	75.1	74.3	76.2
Lma_LMJF_28_1530_157871774	39.8	40.0	40.3	36.1	37.8	35.3	31.0	32.0	55.1	61.4	58.8	58.2	63.5	55.8	62.3	82.1	82.1	XX	75.1	76.1	77.3	75.1	77.8	77.2	76.6	76.6	75.4	74.6	73.7	75.7
Scce_TIF2_6322323	41.1	39.4	40.1	40.5	39.0	33.5	35.7	35.7	58.0	66.4	62.9	56.7	63.5	54.7	62.9	56.1	54.7	54.1	XX	83.1	82.8	81.6	80.1	79.8	79.2	81.0	81.9	75.7	75.4	75.4
Hsa{EIF4A1_4503529	41.2	41.3	40.7	41.6	39.0	36.1	35.7	36.3	62.0	71.7	65.0	60.3	65.0	59.8	65.3	56.6	56.6	54.5	69.7	XX	98.0	81.9	84.3	84.3	84.0	85.1	84.8	78.2	78.4	78.9
Hsa{EIF4A2_83700235	42.2	42.1	41.6	40.5	38.5	35.7	35.9	36.3	61.4	72.9	64.7	61.5	66.2	59.2	66.2	56.9	56.6	55.7	69.1	93.0	XX	83.4	85.4	85.4	85.1	85.1	84.8	79.0	79.0	79.8
Ddi_ifdA_66825125	41.8	40.0	40.3	41.9	37.8	36.1	35.6	35.9	58.3	64.3	61.1	57.0	61.7	58.2	61.7	51.5	52.3	52.6	64.9	67.3	68.5	XX	83.3	82.7	83.6	81.0	81.3	76.9	77.2	78.3
Ath{EIF4A1_79313227	40.7	41.0	41.0	39.8	38.6	36.0	36.2	34.6	60.9	69.6	63.2	61.4	67.5	59.9	65.5	57.3	55.6	55.6	67.0	74.6	75.8	71.1	XX	99.1	98.0	83.3	85.1	77.2	78.0	78.8
Ath{EIF4A-2_15221761	41.0	41.5	41.0	39.8	38.6	36.0	35.2	34.2	60.0	69.6	63.5	60.5	66.7	59.9	65.5	57.3	55.3	55.8	66.4	74.6	75.8	70.8	97.7	XX	97.4	83.0	83.9	77.2	77.5	78.3
Ath_AT1G72730_15218574	41.5	40.4	40.4	38.7	39.2	36.7	35.2	35.3	61.2	68.7	61.1	60.5	66.1	58.2	62.9	56.1	55.3	55.6	65.2	73.5	74.3	71.9	94.7	93.9	XX	81.9	83.3	76.9	77.7	78.8
Pfa_H45_124810293	41.2	39.1	39.2	40.7	37.2	34.3	35.4	33.0	59.4	67.8	62.6	61.1	65.5	59.4	64.0	54.7	53.5	53.2	63.5	72.0	71.7	67.0	72.2	71.9	70.2	XX	93.0	76.0	75.4	76.2
Tgo_TGME49_050770_237836123	39.2	39.2	39.2	40.9	36.6	35.0	34.1	33.3	59.7	69.0	65.8	59.9	65.8	61.1	64.6	55.6	54.1	52.6	65.2	72.3	72.0	67.5	72.8	73.1	71.1	84.5	XX	77.2	77.2	78.6
Tcr_Tc00.1047053510155.180_71666325	40.2	41.7	42.0	39.2	38.8	33.7	33.0	32.8	56.2	58.1	53.2	53.2	56.4	49.1	55.8	53.2	52.0	50.6	57.5	59.5	60.8	57.8	61.8	60.7	59.5	57.2	57.5	XX	98.6	96.2
Tbr_Tb09.160.3270_71744488	41.0	41.2	41.5	38.4	38.5	34.4	34.0	33.0	56.2	58.4	53.5	53.2	56.9	50.3	55.5	53.2	52.0	50.9	57.8	60.8	61.1	58.7	62.7	61.6	61.0	56.6	58.4	95.9	XX	95.4
Lma_LMJF_01_0770_389592463	40.6	41.1	41.4	39.4	39.2	34.6	32.1	33.6	56.9	60.0	54.8	55.7	59.7	51.3	56.2	53.3	53.0	50.4	58.0	61.3	62.7	60.6	64.3	63.2	62.3	58.8	59.7	90.1	89.9	XX

Table S1. Similarity of Hel45 with other eukaryotic RNA helicases. Percentage of similarity (upper diagonal) and identity (lower diagonal) among proteins of the DEAD-box helicase family belonging to representative species of different eukaryotic groups. Hel45 is shown as Tcr_Tc00.1047053506587.40_71418343 and the other sequences are named accordingly: organism abbreviation, gene name and GenBank Identifier (GI) delimited by underscores. The organism abbreviations are: Scce: *Saccharomyces cerevisiae* (Fungi), Hsa: *Homo sapiens* (Metazoa), Ddi: *Dictyostelium discoideum* (Amoebozoa), Ath: *Arabidopsis thaliana* (Plantae), Pfa: *Plasmodium falciparum* (Chromalveolata), Tgo: *Toxoplasma gondii* (Chromalveolata), Tcr: *Trypanosoma cruzi* (Excavata), Tbr: *Trypanosoma brucei* (Excavata), Lma: *Leishmania major* (Excavata).

4.2. CAPÍTULO 2

“Análises funcionais de Hel45: possível envolvimento na regulação de proteínas específicas e associação com proteínas de EJC, de transporte de mRNA e a um novo receptor com domínio do tipo NTF2 exclusivo de tripanossomatídeos”

Conforme apresentado anteriormente, Hel45 é uma proteína que migra entre o núcleo e o citoplasma, dependente da transcrição ativa e da exportação de mRNA pelo receptor Mex67. Apresentou também grande similaridade com a RNA helicase Dbp5 e, principalmente, com eIF4AIII. Porém, a ortologia de Hel45 ainda não estava clara para o delineamento e o aprofundamento dos estudos. Assim, neste capítulo reanalisamos essa semelhança de Hel45 com outras proteínas a partir de uma análise filogenética. Além disso, também destacamos algumas evidências funcionais através dos sistemas de genética reversa (nocaute em *T. cruzi* e RNAi em *T. brucei*) e, por fim, buscamos possíveis parceiros de Hel45. Desse modo, por questão didática, o capítulo foi dividido em três tópicos na apresentação desses resultados.

4.2.1. Análise de filogenia de Hel45

Em um primeiro momento, realizamos uma análise *in silico* mais aprofundada de Hel45 a partir do estudo filogenético das RNA helicases Dbp5/DDX19 e membros eIF4A (eIF4A, eIF4AII e eIF4AIII) que funcionalmente estão descritas na literatura. Apesar de apresentarem menor similaridade a Hel45, Dhh1/DDX6 e Sub2/DDX39/UAP56 foram utilizadas apenas para comparação (controle negativo) nas análises. Para isso, foi realizada a busca nos bancos de dados por ortólogos dessas proteínas através de espécies representativas de grupos evolutivos (Fungi, Metazoa, Amoebozoa, Plantae, Chromalveolata, Excavata). As proteínas ortólogas identificadas foram organizadas em cores distintas na Figura 2.1. Não foi encontrado qualquer ortólogo de Dbp5 em tripanossomatídeos, diferentemente de parasitas do grupo Apicomplexas.

Proteínas	Espécie	Código	GI
DBP5/DDX19	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (Fungi)	Sce_DBP5	6324620
	<i>Homo sapiens</i> (Metazoa)	Hsa_DDX19B	6005743
	<i>Homo sapiens</i> (Metazoa)	Hsa_DDX19A	8922886
	<i>Homo sapiens</i> (Metazoa)	Hsa_DDX25	164419732
	<i>Dictyostelium discoideum</i> (Amoebozoa)	Ddi_helC	66812908
	<i>Arabidopsis thaliana</i> (Plantae)	Ath_LOS4	15231748
	<i>Plasmodium falciparum</i> (Chromalveolata)	Pfal_PF14_0563	124810005
EIF4A	<i>Toxoplasma gondii</i> (Chromalveolata)	Tgo_TGME49_020860	237841277
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (Fungi)	Sce_FAL1	398365053
	<i>Homo sapiens</i> (Metazoa)	Hsa{EIF4A3	7661920
	<i>Dictyostelium discoideum</i> (Amoebozoa)	Ddi_tifA	66825831
	<i>Arabidopsis thaliana</i> (Plantae)	Ath_AT1G51380	15223841
	<i>Arabidopsis thaliana</i> (Plantae)	Ath{EIF4A-III	15230945
	<i>Plasmodium falciparum</i> (Chromalveolata)	Pfa_PFD1070w	124505577
	<i>Toxoplasma gondii</i> (Chromalveolata)	Tgo_TGME49_056770	237831253
	<i>Trypanosoma cruzi</i> (Excavata)	Tcr_Tc00.1047053506587.40 (TcHel45)	71418343
	<i>Trypanosoma brucei</i> (Excavata)	Tbr_Tb11.12.0011 (TbHel46)	71756053
	<i>Leishmania major</i> (Excavata)	Lma_LMJF_28_1530	157871774
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (Fungi)	Sce_TIF2	6322323
	<i>Homo sapiens</i> (Metazoa)	Hsa{EIF4A1	4503529
	<i>Homo sapiens</i> (Metazoa)	Hsa{EIF4A2	83700235
	<i>Dictyostelium discoideum</i> (Amoebozoa)	Ddi_ifdA	66825125
	<i>Arabidopsis thaliana</i> (Plantae)	Ath{EIF4A1	79313227
	<i>Arabidopsis thaliana</i> (Plantae)	Ath{EIF4A-2	15221761
	<i>Arabidopsis thaliana</i> (Plantae)	Ath_AT1G72730	15218574
	<i>Plasmodium falciparum</i> (Chromalveolata)	Pfa_H45	124810293
	<i>Toxoplasma gondii</i> (Chromalveolata)	Tgo_TGME49_050770	237836123
<i>Trypanosoma cruzi</i> (Excavata)	Tcr_Tc00.1047053510155.180 (TcelF4A)	71666325	
<i>Trypanosoma brucei</i> (Excavata)	Tbr_Tb09.160.3270 (TbelF4A)	71744488	
<i>Leishmania major</i> (Excavata)	Lma_LMJF_01_0770 (LmelF4A)	389592463	
DHH1/DDX6	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (Fungi)	Sce_DHH1	6320041
	<i>Homo sapiens</i> (Metazoa)	Hsa_DDX6	164664518
	<i>Dictyostelium discoideum</i> (Amoebozoa)	Ddi_DDX6	66802312
	<i>Arabidopsis thaliana</i> (Plantae)	Ath_RH8	22328183
	<i>Arabidopsis thaliana</i> (Plantae)	Ath_AT3G61240	15233064
	<i>Arabidopsis thaliana</i> (Plantae)	Ath_AT2G45810	15225898
	<i>Plasmodium falciparum</i> (Chromalveolata)	Pfa_PFC0915w	124505073
	<i>Toxoplasma gondii</i> (Chromalveolata)	Tgo_TGME49_113010	237830431
	<i>Trypanosoma cruzi</i> (Excavata)	Tcr_Tc00.1047053506959.30	71650885
	<i>Trypanosoma brucei</i> (Excavata)	Tbr_Tb10.70.3290	71747184
<i>Leishmania major</i> (Excavata)	Lma_LMJF_35_0370	389594423	
SUB2/DDX39/UAP56	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (Fungi)	Sce_SUB2	6320119
	<i>Homo sapiens</i> (Metazoa)	Hsa_DDX39B	4758112
	<i>Homo sapiens</i> (Metazoa)	Hsa_DDX39A	21040371
	<i>Dictyostelium discoideum</i> (Amoebozoa)	Ddi_UAP56	66826121
	<i>Arabidopsis thaliana</i> (Plantae)	Ath_AT5G11200	238481238
	<i>Arabidopsis thaliana</i> (Plantae)	Ath_AT5G11170	186522071
	<i>Plasmodium falciparum</i> (Chromalveolata)	Pfa_UAP56	124801080
	<i>Toxoplasma gondii</i> (Chromalveolata)	Tgo_TGME49_016860	237843393
	<i>Trypanosoma cruzi</i> (Excavata)	Tcr_Tc00.1047053508319.40 (TcSub2)	71411514
	<i>Trypanosoma brucei</i> (Excavata)	Tbr_Tb10.70.7730	71746514
<i>Leishmania major</i> (Excavata)	Lma_LMJF_21_1552	157869116	

FIGURA 2.1. – QUADRO CONTENDO A IDENTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS RNA HELICASES ORTÓLOGAS DE DBP5/DDX19, MEMBROS EIF4A (EIF4AI, EIF4AII E EIF4AIII), DHH1/DDX6 E SUB2/DDX39/UAP56 EM ESPÉCIES REPRESENTATIVAS DA FILOGENIA. O acesso às sequências identificadas das proteínas ortólogas nos bancos de dados do GeneBank pode ser realizada através de número de GI. Cada grupo proteico foi identificado por uma diferente cor para melhor visualização e correspondência com as análises posteriores (Tabela 2.1 e Figura 2.2). Foram utilizadas as sequências de Fungi: Sce – *Saccharomyces cerevisiae*; Metazoa: Hsa – *Homo sapiens*; Amoebozoa: Ddi – *Dictyostelium discoideum*; Plantae: Ath – *Arabidopsis thaliana*; Chromalveolata: Pfa – *Plasmodium falciparum*, Tgo – *Toxoplasma gondii*; Excavata: Tcr – *Trypanosoma cruzi*, Tbr – *Trypanosoma brucei*, Lma – *Leishmania major*.

A análise comparativa na Tabela 2.1 mostra a similaridade e identidade entre os ortólogos e entre proteínas de grupos diferentes (Figura 2.1). Hel45 apresentou maior similaridade ao grupo eIF4A, subgrupos eIF4AIII, do que às proteínas de Dbp5 em humanos (80,7% a eIF4AIII / 60.8% a Dbp5), em fungos (76,8% a eIF4AIII / 60.3% a Dbp5) e em *P. falciparum* (76.0% a eIF4AIII / 52.7% a Dbp5). Além disso, os ortólogos de Hel45 em tripanossomatídeos também se mostraram bastante conservados em *T. brucei* (similaridade de 97.4% e identidade de 92,7%) e em *Leishmania major* (similaridade de 91,8% e identidade de 82,1%).

Os dados na Tabela 2.1 foram usados para análise de filogenia (Figura 2.2), feita através do alinhamento de 299 posições (79% do total de 378 aminoácidos) com altos valores de suporte dos ramos para definição dos diferentes grupos proteicos. Os resultados evidenciam a presença de um ancestral comum entre todas RNA helicases analisadas (Figura 2.2). Além disso, proteínas ortólogas à Sub2/UAP56 (lilás) e Dhh1/DDX6 (azul claro) tem clados com valor 1 de suporte e apresentam-se mais próximas entre si do que com os outros grupos (suporte de 0,99). Já proteínas ortólogas à Dbp5 (verde) se agruparam em clados de alto valor de suporte (0,95) com eIF4A (amarelo) demonstrando a similaridade entre essas proteínas. Desse modo, esses dados indicam que Hel45 é a ortóloga de eIF4AIII de mamíferos, demonstrado pela inclusão dela no clado desse grupo.

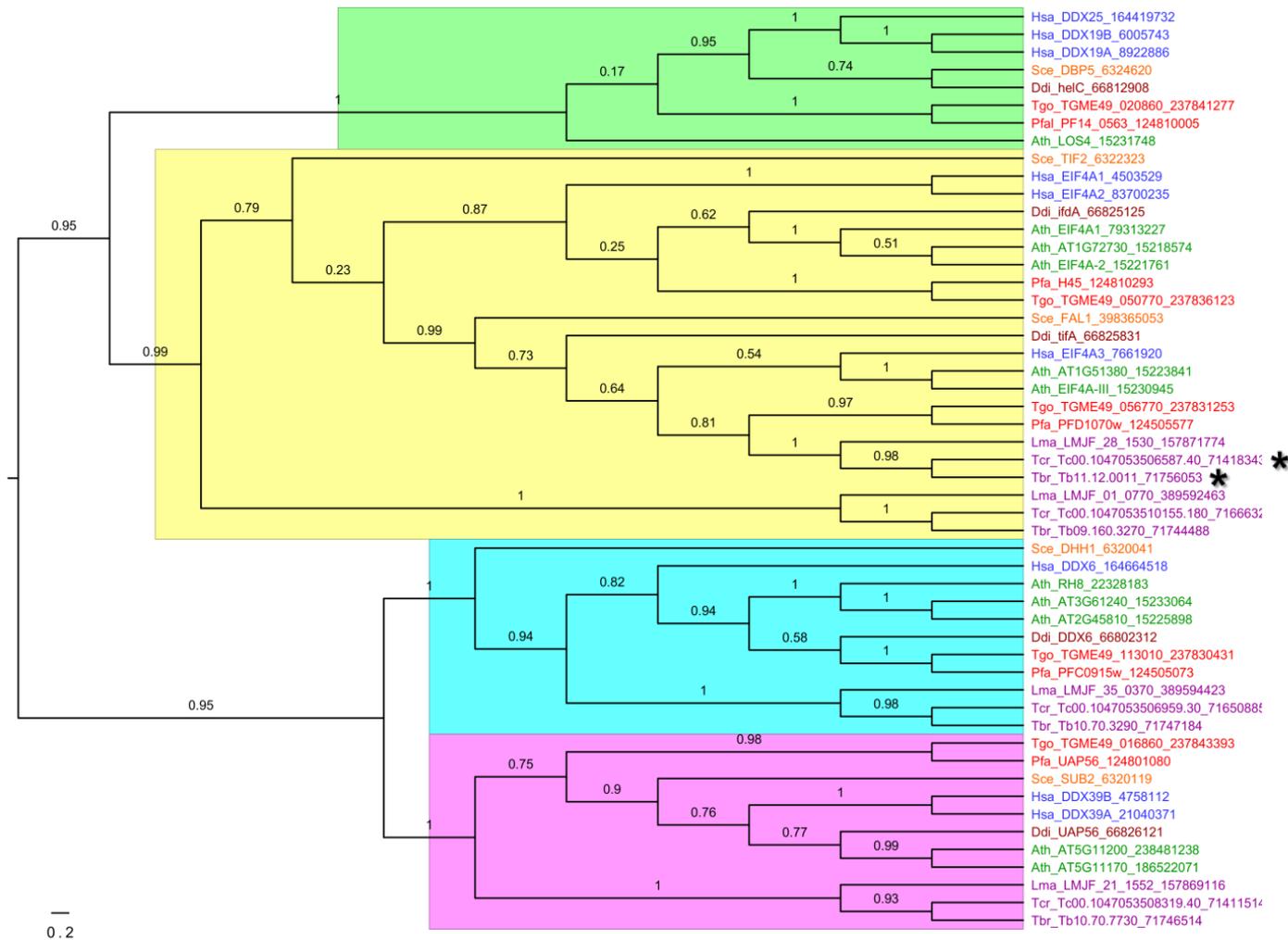


FIGURA 2.2 - FILOGENIA DE Hel45. Cada proteína utilizada na construção da filogenia pode ser identificada pelo código e ser acessada no GenBank através do GI disponíveis na Figura 4.1. Cada grupo de proteínas ortólogas foi organizado em diferentes cores: clados em verde (Dbp5/DDX19), amarelo (membros de eIF4A), azul claro (Dhh1/DDX6) e lilás (Sub2/DDX39/UAP56). As cores das proteínas correspondentes organizadas a direita representam os grupos evolutivos das espécies representativas (Fungi: Scs – *Saccharomyces cerevisiae*; Metazoa: Hsa – *Homo sapiens*; Amoebozoa: Ddi – *Dictyostelium discoideum*; Plantae: Ath – *Arabidopsis thaliana*; Chromalveolata: Pfa – *Plasmodium falciparum*, Tgo – *Toxoplasma gondii*; Excavata: Tcr – *Trypanosoma cruzi*, Tbr – *Trypanosoma brucei*, Lma – *Leishmania major*). * representam os ortólogos de Hel45. Barra de escala representa o número estimado de substituições por sítio.

4.2.2. Genética reversa de Hel45: Nocaute gênico em *T. cruzi* e RNAi em *T. brucei*

Para melhor entendimento da função de Hel45, foram gerados os sistemas de genética reversa: nocaute gênico (KO) de Hel45 em *T. cruzi* e diminuição da expressão da proteína ortóloga (TbHel46) após indução de RNAi em *T. brucei*. No primeiro caso, o KO foi realizado através de protocolos estabelecidos no Instituto Carlos Chagas (DE SOUZA *et al.*, 2010) e utilizando o vetor pNEO1, que baseou-se na substituição do gene de Hel45 por marcas de resistência à Neomicina (*neo*), para o nocaute do primeiro alelo, e à Higromicina (*hygro*), para o nocaute do segundo alelo (Figura 2.3). A confirmação da clonagem e a amplificação/purificação dos cassetes utilizados para transfecção (destacados em laranja e vermelho para o nocaute do 1° e 2° alelo, respectivamente) no parasita estão representados na Figura 2.3.

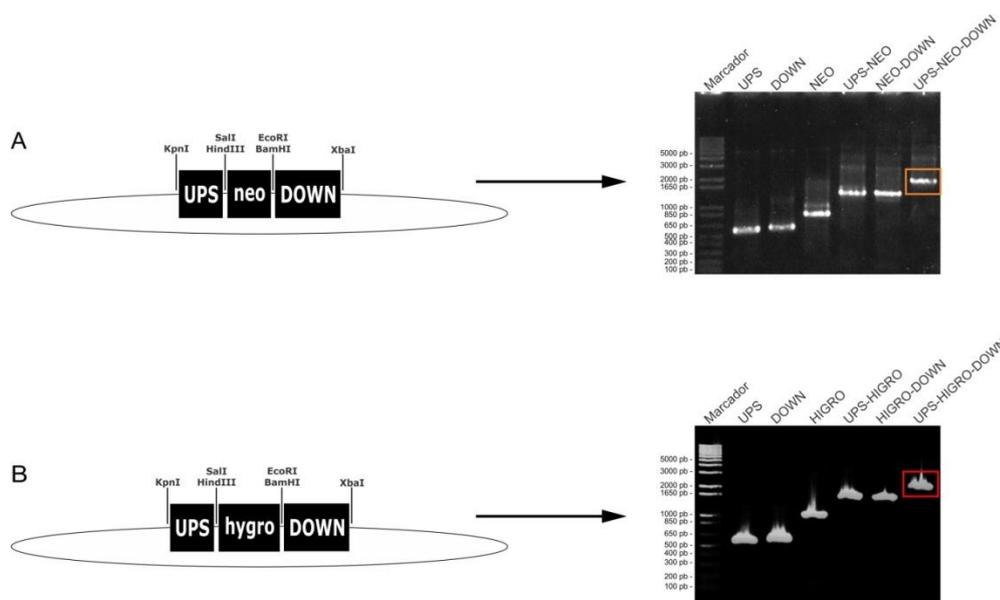


FIGURA 2.3 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA PARA DOS CASSETES UTILIZADOS O NOCAUTE DE Hel45 EM *Trypanosoma cruzi*. Em A e B, estão as construções realizadas utilizando o vetor pNEO1 com a clonagem de sequências correspondentes às regiões intergênicas a montante (UPS - *upstream*) e a jusante (DOWN – *downstream*) do gene de Hel45, flanqueando os genes de marcas de resistência a neomicina (*neo*) (em A) or a higromicina (*hygro*) (em B). À direita estão os perfis de eletroforese dos produtos de amplificação por PCR de fragmentos obtidos por combinações de *primers* para a confirmação das clonagens: UPS – UPSF/UPSR; DOWN – DOWNF/DOWNR; NEO – NEOF/NEOR; UPS-NEO – UPSF/NEOR; NEO-DOWN - NEOF/DOWNR; HIGRO – HIGROF/HIGROR; UPS-HIGRO – UPSF/HIGROR; HIGRO-DOWN – HIGROF/DOWNR; UPS-NEO-DOWN/UPS-HIGRO-DOWN – UPSF/DOWNR. Os fragmentos UPS-NEO-DOWN (em laranja) e UPS-HIGRO-DOWN (em vermelho) foram amplificados por PCR e usados para transfecção e obtenção dos parasitas nocautes para Hel45. Eletroforese em gel de agarose 1% corado em brometo de etídeo 0,5 µg/ml. Marcador molecular = *1kb plus DNA Ladder* (Invitrogen). Tamanho esperado para UPS = 606 pb; DOWN = 548 pb; NEO = 795 pb; UPS-NEO = 1401 pb; NEO-DOWN = 1343 pb; HIGRO = 1026 pb; UPS-HIGRO = 1632 pb; HIGRO-DOWN = 1574 pb; UPS-NEO-DOWN = 1949 pb; UPS-HIGRO-DOWN = 2180 pb.

KO de ambos os alelos foi confirmado inicialmente por PCR, utilizando combinações de oligonucleotídeos iniciadores que anelam em regiões codificantes, intergênicas e externas às regiões intergênicas (Figura 2.4, destacados em laranja e vermelho para o nocaute do 1° e 2° alelo, respectivamente). Outros métodos de confirmação foram a técnica de gel de eletroforese em campo pulsado (PFGE - *pulsed-field gel electrophoresis*) seguido por *Southern blot* utilizando sondas marcadas radioativamente para detecção dos genes *hel45*, *neo*, *higro* (Figure 2.5A), além de *Western blot* com anticorpo anti-Hel45 (Figure 2.5 B).

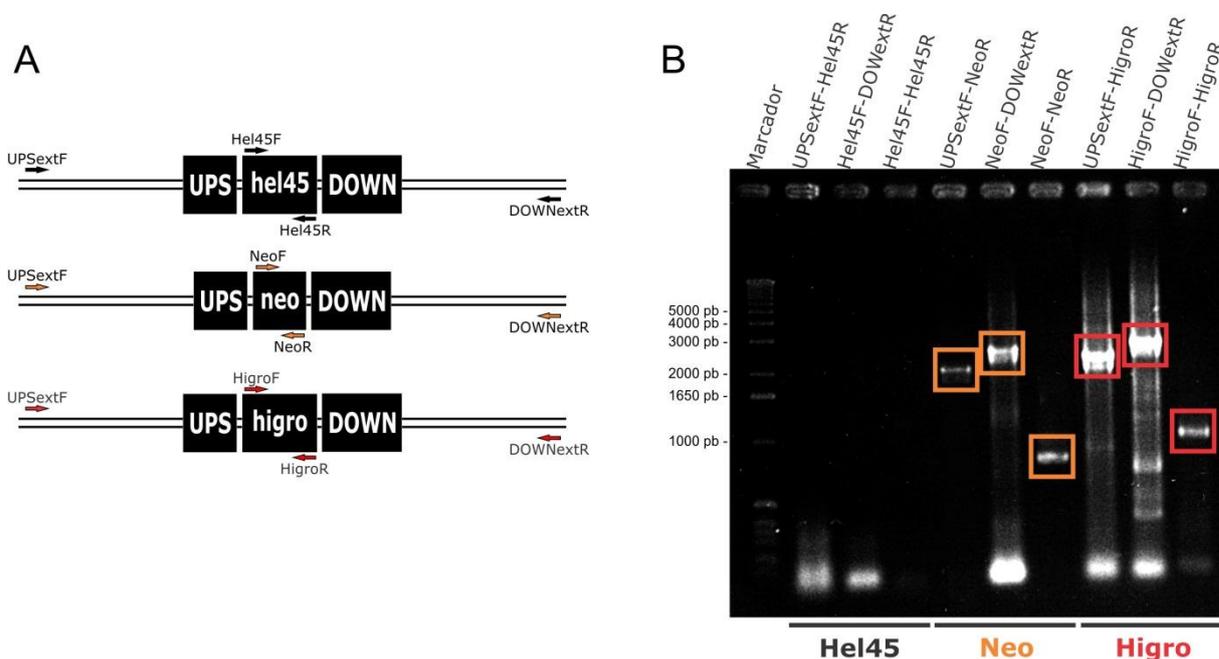


FIGURA 2.4 – ANÁLISE POR ELETROFORESE DE DNA GÊNOMICO PARA CONFIRMAÇÃO DO NOCAUTE DE *Hel45* POR PCR. (A) Representação esquemática do anelamento dos oligonucleotídeos iniciadores e (B) perfis de eletroforese da amplificação por PCR utilizando DNA genômico como molde e que foi extraído de parasitas nocautes para ambos os genes alelos, e combinações dos seguintes pares de *primers*: UPSextF/*Hel45R*; *Hel45F*/*DOWNNextR*; *Hel45F*/*Hel45R*; UPSextF/*NEOR*; *NEOF*/*DOWNNextR*; *NEOF*/*NEOR*; UPSextF/*HIGROR*; *HIGROF*/*DOWNNextR*; *HIGROF*/*HIGROR*. Foram utilizados *primers* que anelam em regiões mais à montante de UPS (UPSextF) e mais à jusante de DOWN (*DOWNNextR*). Eletroforese em gel de agarose 1% corado em brometo de etídeo 0,5 µg/ml. Marcador molecular = 1 kb plus DNA Ladder (Invitrogen). Tamanho esperado para UPSextF-*Hel45R* = 2569 pb; *Hel45F*-*DOWNNextR* = 2969 pb; *Hel45F*-*Hel45R* = 1188 pb; UPSextF-*NeoR* = 2176 pb; *NeoF*-*DOWNNextR* = 2576 pb; *NeoF*-*NeoR* = 795 pb; UPSextF-*HigroR* = 2407 pb; *HigroF*-*DOWNNextR* = 2807 pb; *HigroF*-*HigroR* = 1026 pb.

Após obtenção da linhagem nocaute de *Hel45*, observamos que a ausência do gene não foi letal aos parasitas, mas interferiu na replicação (Figura 2.5C). A concentração de células na cultura de parasitas KO foi aproximadamente 20% menor do que da cultura de parasitas selvagem (WT) após 72 horas de cultivo. Além

disso, o pico da curva de crescimento dos parasitas KO foi alcançado somente após 168 horas, enquanto que para WT, foi alcançado em 120 horas. Células KO também apresentaram maior tempo de duplicação ($33.72h \pm 2.49h$) comparado às células selvagem ($18.42h \pm 1.85h$). Por isso, interpretamos que mesmo não sendo letal ao parasita o nocaute, de alguma forma, tornou a duplicação do parasita mais lenta.

Para confirmar esta observação, foi realizada a contagem diferencial (Figuras 2.6A e 2.6B) de células com núcleo e cinetoplasto duplicados (2N/2K) (Figura 2.5D) e observamos uma maior proporção de células em fase final de citocinese: aproximadamente 30%, comparado a apenas 10% no WT (Figura 2.6A) no ponto de 72 horas. Ou seja, maior número de células em divisão incompleta na população KO. Porém, observamos pela análise ultraestrutural que os parasitas KO e WT são muito similares: sem sinais morfológicos de morte celular no núcleo, mitocôndria ou formação de vesículas intracelulares no citoplasma (Figura 2.6C.2). Desse modo, o maior número de células em fase final de divisão como consequência do nocaute de Hel45 não é decorrente de indução de morte de células.

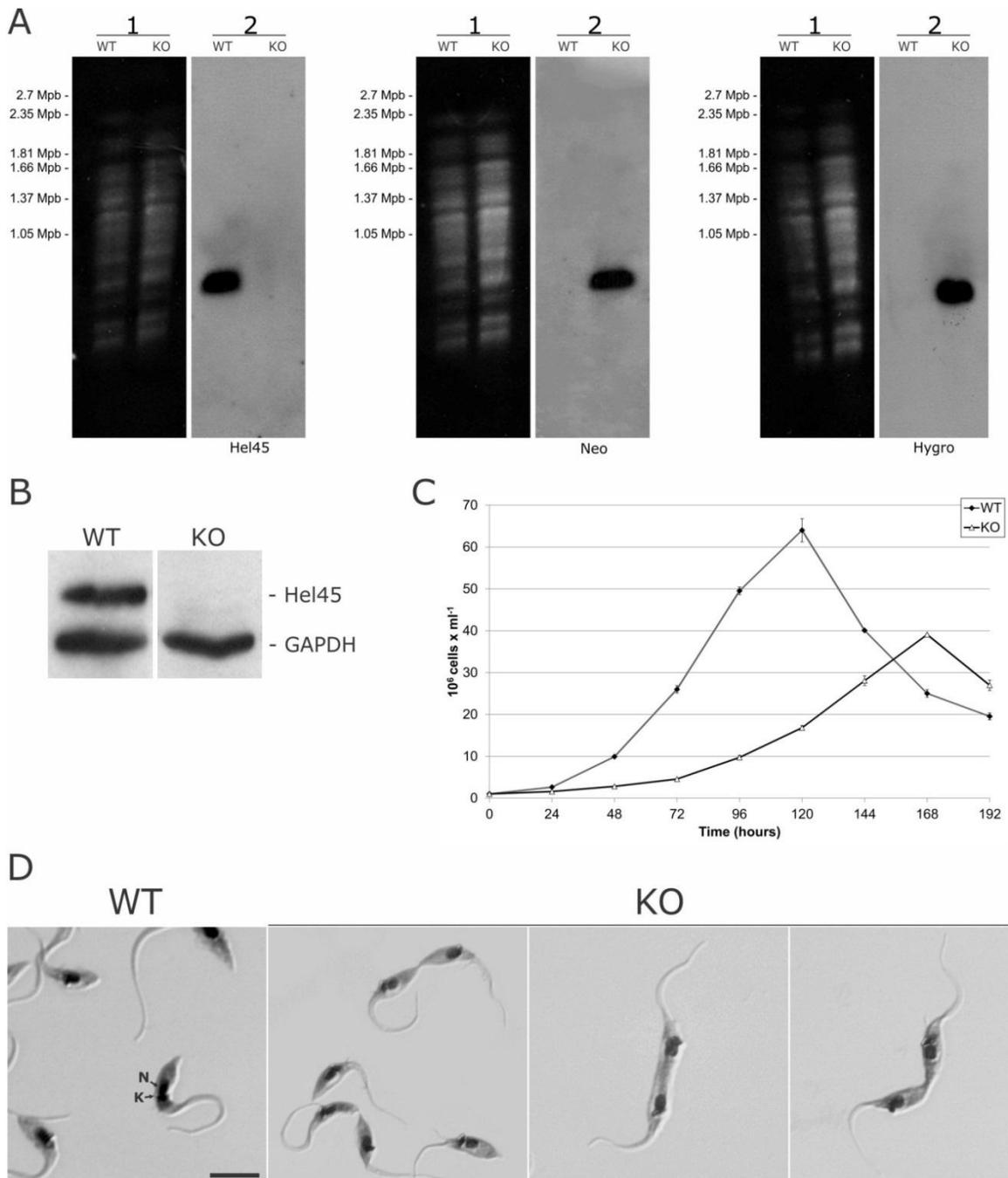


FIGURA 2.5 – ANÁLISE DO NOCAUTE DE Hel45 EM *T. cruzi*. (A) Eletroforese em campo pulsado seguido da análise de *Southern blot* de DNA genômico de parasitas selvagem (WT) ou nocaute (KO). Marcador = *CHEF DNA - H. wingei Chromosomes* (Bio-Rad). 1 = Perfil eletroforético de DNA genômico de WT e KO. 2 = Autorradiograma da hibridação utilizando como sondas as sequências de Hel45, Neomicina (Neo) e Higromicina (Hygro), marcadas radioativamente. (B) *Western blot* utilizando extrato proteico extraído de parasitas WT e KO analisados com anticorpo anti-Hel45 (diluição 1:500). GAPDH (diluição 1:500) foi usado como controle. (C) Curva de crescimento de parasitas WT e KO. Em cada ponto, a densidade celular nas culturas foi determinada por contagem em triplicata utilizando um contador de partículas (Beckman Coulter, ZTM Series Coulter Counter® Cell). (D) A morfologia celular foi analisada pelo método de panótico rápido. N = núcleo. K = cinetoplasto. Barra = 5 µm.

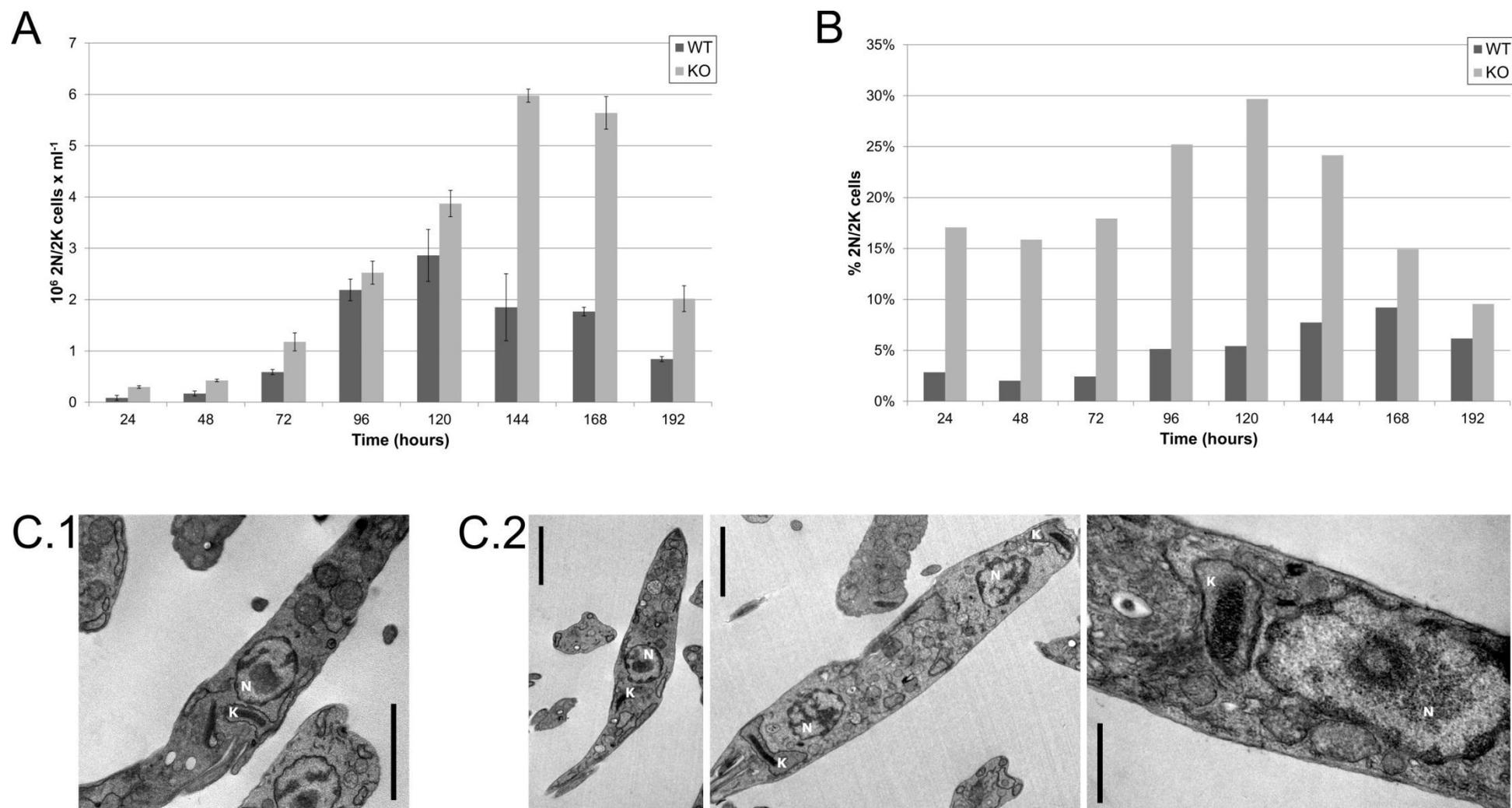


FIGURA 2.6 – EFEITOS DO NOCAUTE DE *HeI45*. (A e B) Contagem diferencial na população nocaute. (A) Concentração absoluta de células com dois núcleos e dois cinetoplastos (2N/2K) foi determinada em triplicata por contagem em câmara de Neubauer durante 192 horas para parasitas selvagens e nocautes. A barra de erro indica o erro padrão das três contagens independentes. (B) Concentração relativa de células 2N/2K comparadas à população total (1N/1K e 2N/2K) durante o período de 192 horas. (C) Análise ultraestrutural de epimastigotas WT (C.1) e KO contendo 1N/1K ou 2N/2K (C.2) por microscopia eletrônica de transmissão. N = núcleo; K = cinetoplasto. Barra = 2 μ m (em C.1 e C.2) e 0,5 μ m (em C.3)

Como o KO afetou o crescimento, foi investigado também se a ausência do gene poderia afetar a capacidade de diferenciação do parasita durante a transformação da forma epimastigota para a forma infectiva tripomastigota metacíclica. Para tanto, foi utilizado o protocolo de metaciclogênese *in vitro* estabelecido por Contreras *et al.*, 1985 (CONTRERAS *et al.*, 1985; BONALDO *et al.*, 1988). Neste caso, epimastigotas foram sujeitas a estresse nutricional em meio TAU (TAU - *triatomine artificial urine*), incubados em meio TAU3AAG e a diferenciação ocorreu após adesão das células ao frasco de cultura, com liberação de tripomastigotas metacíclicos para o sobrenadante que foram contados nas populações WT e KO. A população KO apresentou uma menor quantidade de formas tripomastigotas metacíclicas, considerando todos os pontos de tempo de coleta de epimastigotas para realização inicial dos experimentos (Figuras 2.7A, 2.7C e 2.7E). Por exemplo, epimastigotas KO de culturas com cinco dias que foram sujeitos a diferenciação durante 72 horas apresentaram 57,6% menos tripomastigotas metacíclicos que a população WT.

Vale ressaltar que nas condições de metaciclogênese *in vitro* não ocorre proliferação celular e a adesão é essencial para a indução da diferenciação (CONTRERAS *et al.*, 1985; BONALDO *et al.*, 1988). Assim, verificamos que a adesão aparentemente não foi afetada nas culturas KO (Figuras 2.7B, 2.7D e 2.7F) e, baseado nessas observações, acreditamos que o efeito do KO de Hel45 na metaciclogênese provavelmente ocorreu após a etapa de adesão.

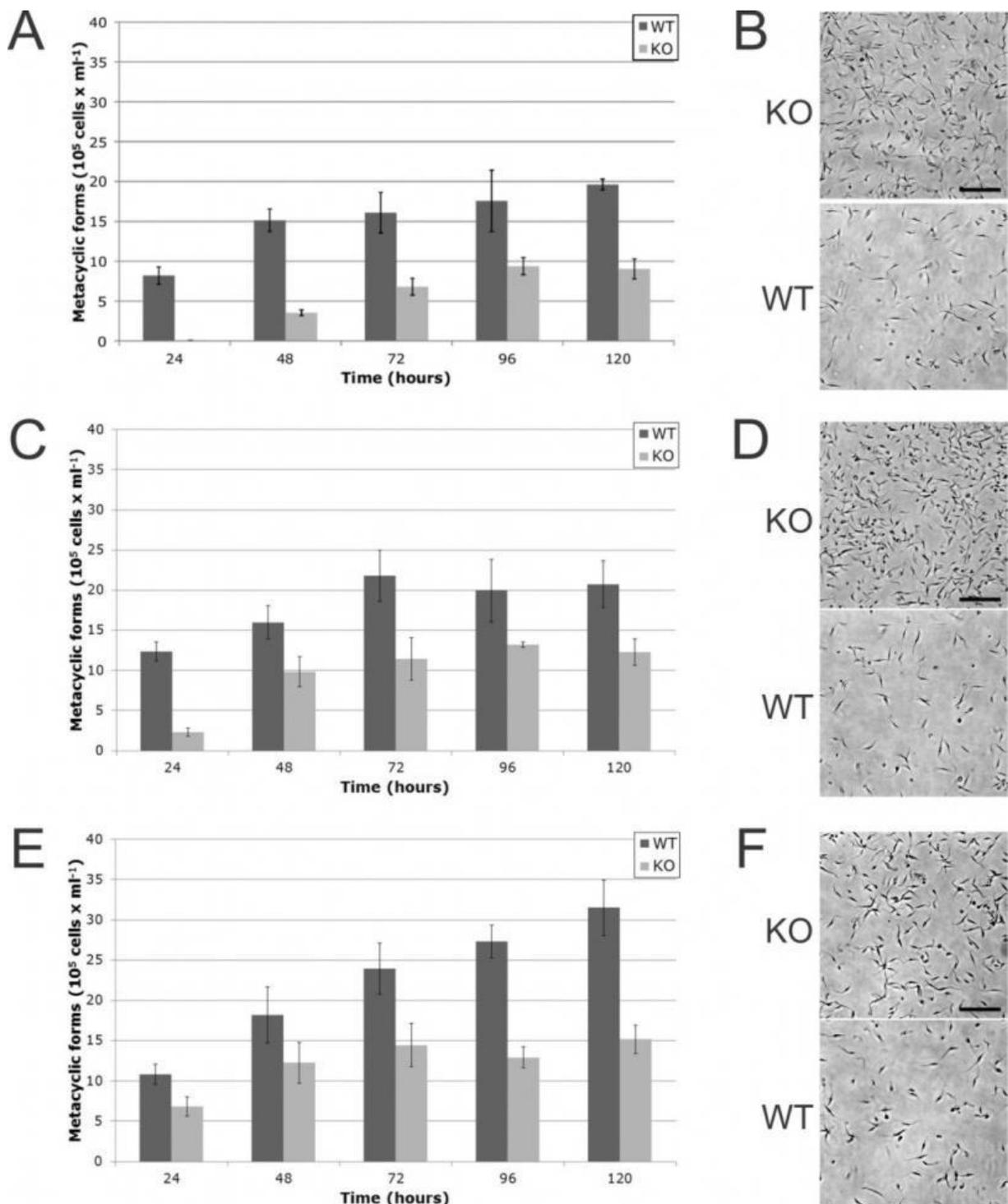


FIGURA 2.7 – EFEITO DO NOCAUTE DURANTE A DIFERENCIAÇÃO. Culturas de epimastigotas KO e WT de 5, 7 e 9 dias de crescimento (A, C e E, respectivamente) foram submetidas ao estresse nutricional. A densidade de formas tripomastigotas metacíclicas foi determinada durante o período de 120 horas. Diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) foram detectadas para todas as comparações entre parasitas WT e KO. Imagens representativas *in vivo* de epimastigotas WT e KO aderidos aos frascos de cultura sobre condições de diferenciação após 72 horas após 5 (em B), 7 (em D) e 9 dias (em F) de cultura. Barra = 50 μ m.

Observamos que Hel45 possui um ortólogo em *T. brucei* com similaridade de 97% (demonstrado na Tabela 2.1 e pelo alinhamento na Figura 2.8A), que foi denominado de TbHel46 (RNA helicase de 46 kDa). Assim, visando comparar o fenótipo em outra espécie de tripanossoma, foi utilizado o ortólogo do gene em *T. brucei* na análise comparativa dos efeitos. Desta forma, a clonagem em vetor p2T7-177 do fragmento gênico foi confirmada por digestão do plasmídeo e verificação da liberação de um fragmento de tamanho esperado de 484 pares de base (referente à sequência-alvo do RNAi) (Figura 2.8B). O vetor linearizado foi usado para transfectação em *T. brucei*.

Assim como no KO em *T. cruzi*, a diminuição da expressão de TbHel46 pela indução do RNAi não foi letal ao parasita (Figura 2.8C), porém também alterou a curva de crescimento (Figura 2.8D). No entanto, diferente do KO, a indução do silenciamento de TbHel46 visualmente não aumentou o número de parasitas com divisão incompleta como nos parasitas KO. Este resultado pode ser devido ao fato de que somente a ausência total da proteína poderia desencadear este fenótipo como observado em *T. cruzi*.

A

TcHel45 - - - - - MGDV E Q I V E K E E T D I Q A N V L A I P T F E A M G L K E E L L R G M Y G Y G Y K K P T A I Q K R F I V P F T Q S R D L V 64
TbHel46 M T A T A R S D E E E R A G L H E E T D M Q A N V P T I P T F E A M G L K K D L L H G M Y G Y G Y K K P T A I Q K R F V A P F L Q S R D L V 70

TcHel45 A Q A S S G S G K T S A F C I C L L Q V C Q S A L R E T Q G L V L S P T R E L A L Q T Q D L C N N I G H H M G L A A Y A S I G G K S V E D D 134
TbHel46 A Q A S S G S G K T S A F C I C L L Q A S E P T L R E T Q G L V L S P T R E L A L Q T Q D L C N N I G H Y M G I S A Y A A I G G K S I E D D 140

TcHel45 I R R L E S G V Q I V S G T P G R V F D M I K R R H L R V N H L K T L V L D E A D E M L G K G F K A Q I H D I Y R M I P P L Q V V L V S A T 204
TbHel46 I R R L E S G V Q I V S G T P G R V F D M I K R R H L R V N H L K T L V L D E A D E M L G K G F K A Q I H D I Y R M I P P L Q V V L V S A T 210

TcHel45 L P V D V L E M T E K F M T E P V R I L V R R D E I T V D S I M Q Y F V A V D E E K N K F E T L C D L Y D T L T I A H A V I F C N T R K K V 274
TbHel46 L P V D V L D M T E K F M T E P V R I L V K R D E I T V D S I M Q Y F V S V D E E K N K F D T L C D L Y D T L T I A H A V I F C N T R K K V 280

TcHel45 E Q L A K K M R K E K F S V S C M H G D M P Q A E R D E I M R N F R E G K S R V L I S T D L W S R G I D V E Q V S L V L N Y D L P F S R E Q 344
TbHel46 E Q L A K K M T K E K F T V S F M H G D M P Q A E R D E I M R N F R E G K S R V L I S T D L W S R G I D V E Q V S L V L N Y D L P F S R E Q 350

TcHel45 Y I H R I G R T G R M G R K G L A I S F V K H D E L R L L R D V E Q F Y A T Q I E E L P A N I A D Q F 395
TbHel46 Y I H R I G R T G R M G R K G L A I S F V K H D E L R L L R D V E Q F Y A T Q I E E L P A N V G E Q F 401

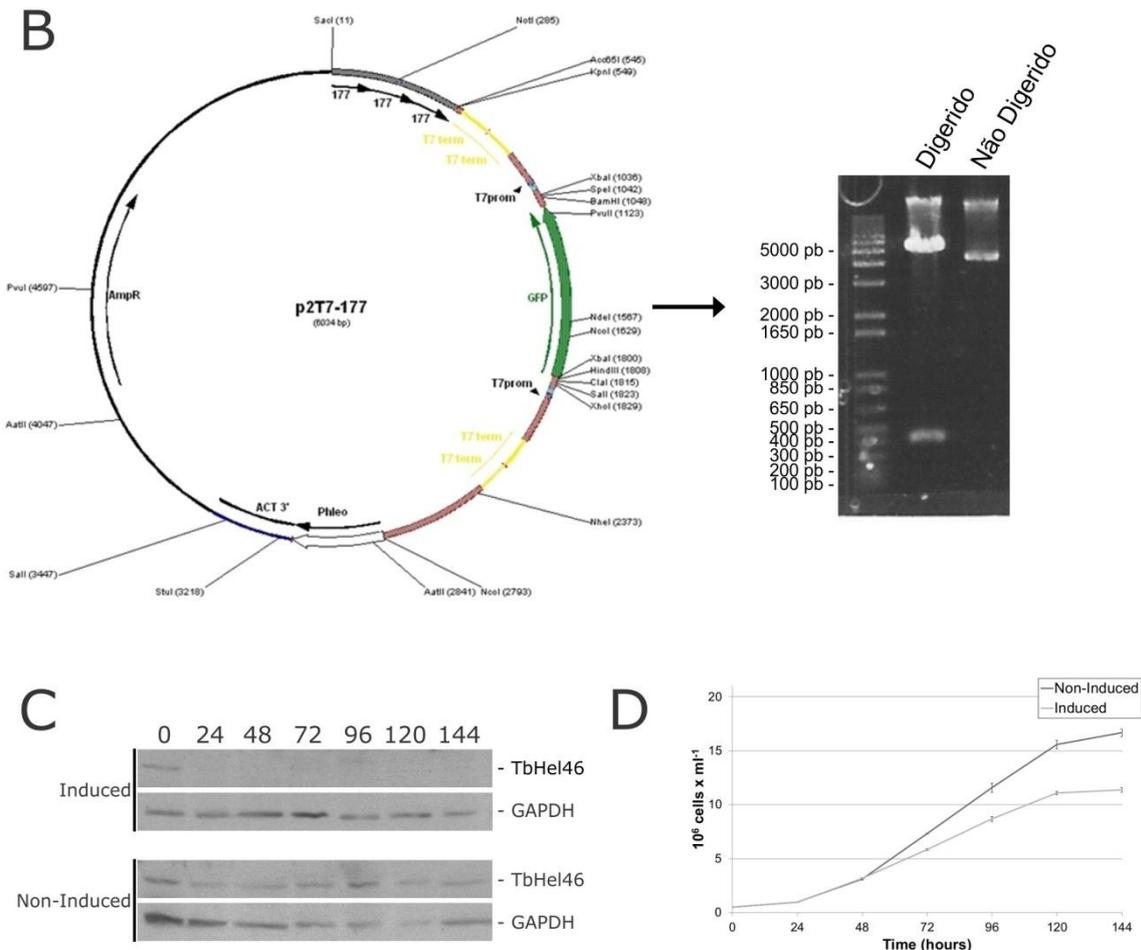


FIGURA 2.8 – ANÁLISE POR RNA DE INTERFERÊNCIA DO ORTÓLOGO DE Hel45 EM *Trypanosoma brucei*. (A) Alinhamento entre TcHel45 e TbHel46 mostrando regiões idênticas (em preto), similares (cinza) e não alinhadas. (B) Representação esquemática e confirmação da clonagem em vetor p2T7-177 (WICKSTEAD *et al.*, 2002) de fragmento-alvo de TbHel46 para o silenciamento por RNAi. Em verde, a região 1086-1799 correspondente a GFP foi removida para a inserção do fragmento de TbHel46. Perfil de eletroforese do produto de digestão do plasmídeo recombinante com XbaI. Eletroforese em gel de agarose 1% corado em brometo de etídeo 0,5 µg/ml. Marcador molecular = 1Kb plus DNA Ladder (Invitrogen). (C) Análise de Western blot de extrato total proteico e (D) Curva de crescimento de parasitas após indução de RNAi com tetraciclina 2 µg/ml, analisado com anticorpo anti-Hel45 e anti-GAPDH como controle. Para curva, a densidade celular nas culturas em cada ponto foi determinada por contagem em triplicata utilizando um contador de partículas (Beckman Coulter, ZTM Series Coulter Counter® Cell).

Visto que o principal objetivo deste trabalho foi avaliar a participação de Hel45 como componente essencial à exportação de mRNA, outro fenótipo avaliado foi o efeito de nocaute de Hel45 e silenciamento gênico de TbHel46 na distribuição de mRNA poliadenilados através de ensaios de hibridização *in situ* utilizando uma sonda de oligo(dT). Em ambos os casos, a ausência ou o silenciamento gênico não causou acúmulo geral de mRNA no núcleo (Figuras 2.9 e 2.10A). Conforme apresentado anteriormente, somente no nocaute gênico duplo a divisão celular foi afetada e, desse modo, seria mais apropriado aprofundar os estudos na compreensão de outros efeitos como consequência da ausência da proteína em *T. cruzi*. Acreditando que Hel45 pudesse ter um papel na liberação de mRNA para a maquinaria de tradução, uma vez que ela apresentou similaridade a membros do grupo de eIF4A e está localizada em regiões citoplasmáticas próximas de CPN, consideramos que o KO poderia então afetar a síntese proteica. Assim, avaliamos esses efeitos a partir de uma análise qualitativa do perfil de formação dos polissomos sedimentados em gradiente de sacarose e, quantitativa por análise de incorporação metabólica de metionina radioativamente marcada. Foi observado então que o KO de Hel45 alterou o perfil polissomal de sedimentação, com diminuição visível dos picos correspondentes às frações de polissomos (Figura 2.10B), assim como reduziu o nível da atividade da tradução em aproximadamente 53% (Figura 2.10C).

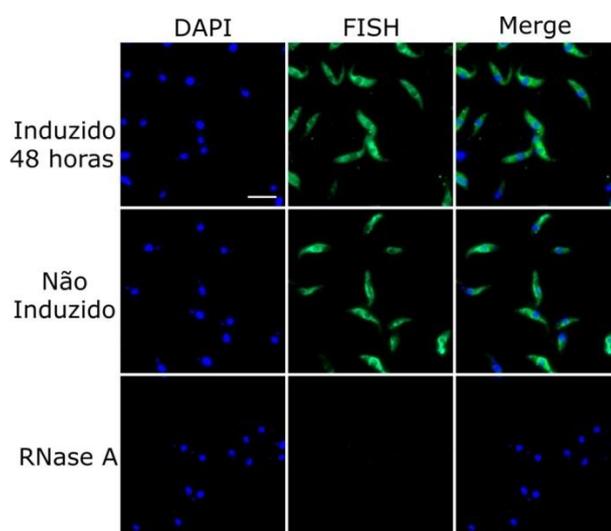


FIGURA 2.9 – ANÁLISE DO EFEITO DE RNAi CONTRA TbHel46 NA LOCALIZAÇÃO DE mRNA EM *T. brucei*. Localização subcelular de mRNAs poliadenilados por hibridização *in situ* fluorescente (FISH) com sonda oligo(dT) marcada com digoxigenina. A detecção da sonda foi realizada por imunofluorescência indireta com anticorpo monoclonal anti-DIG (Sigma-Aldrich, diluição 1:300) seguido por anticorpo secundário conjugado a Alexa 488 (Invitrogen, diluição 1:600). Como controle, RNase A 100 µg/ml foi incubado com o parasita antes da hibridização da sonda (RNase A). DAPI = DNA corado com DAPI. MERGE = colocalização de imagens para DAPI e FISH. Barra = 5 µm.

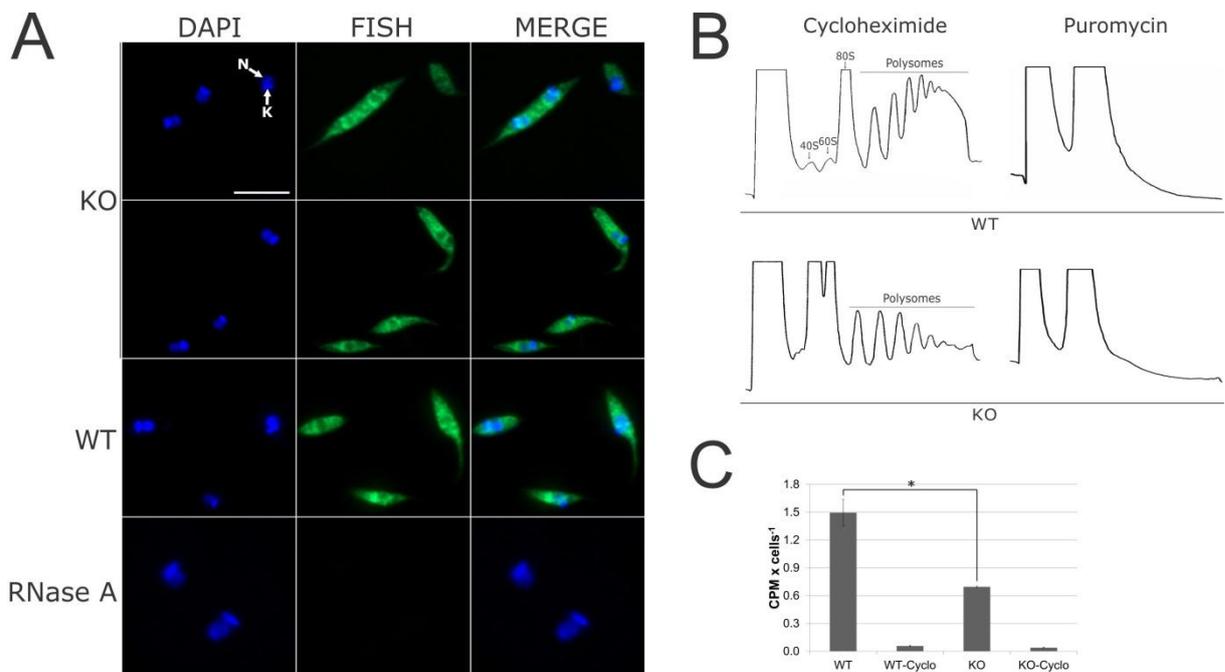


FIGURA 2.10 – ANÁLISE DOS EFEITOS DO KO DE *Hel5* EM *T. cruzi* NA DISTRIBUIÇÃO DE mRNAs E NA TRADUÇÃO EM PARASITAS. (A) localização celular de mRNA por FISH em parasitas nocaute (KO) e selvagem (WT) com sonda oligo(dT) marcada com digoxigenina. A detecção da sonda foi realizada por imunofluorescência indireta com anticorpo monoclonal anti-DIG (Sigma-Aldrich, diluição 1:300) seguido por anticorpo secundário conjugado a Alexa 488 (Invitrogen, diluição 1:600). Como controle, RNase A 100 μg/ml foi incubado com o parasita antes da hibridização da sonda (RNase A). DAPI = DNA corado com DAPI. MERGE = colocalização de imagens para DAPI e FISH. Barra = 5 μm. (B) Perfil polissomal em gradiente de sacarose de parasitas KO e WT tratados com cicloheximida 100 μg/ml ou puromicina 2 mM. (C) Marcação metabólica com metionina [³⁵S] em parasitas WT e KO. Gráfico representa a intensidade de radiação incorporada através de cintilografia. Como controle, parasitas foram tratados com cicloheximida 100 μg/ml (WT-Cyclo ou KO-Cyclo). (*) indica diferença estatisticamente significativa ($p < 0.01$).

Para analisar se os baixos níveis de tradução estariam afetando a expressão global de proteínas, foi realizada a comparação dos proteomas totais de parasitas selvagens e nocautes. Nessa abordagem foi identificado um total de 1694 proteínas, porém, a partir da análise quantitativa da contagem dos espectros, observou-se que a abundância de proteínas era bastante similar entre as amostras de WT e KO e, destes, somente 14 proteínas apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre as amostras analisadas no nível de expressão, correspondendo então às proteínas diferencialmente expressas (destacadas no gráfico Volcano da Figura 2.11A). Foram observadas proteínas com expressão diminuída no KO, anotadas como: *ribosomal protein L37*, *zinc finger protein 2*; *mitochondrial processing peptidase alpha subunit*, *hypothetical protein*; *cyclophilin* e *actin*; e aumentadas: *vacuolar-type proton translocating pyrophosphatase 1*; *hexose transporter*; *membrane-bound acid phosphatase*; *protein tyrosine phosphatase-like protein*; *ATP-dependent DEAD/H RNA helicase*; *NADH-dependent fumarate*

reductase; *U2 splicing auxiliary factor*, *hypothetical protein* (Figura 2.11B). O resultado de proteômica (Figuras 2.11C) também foi confrontado com experimentos de *Western blot* (Figuras 2.11D.1 e 2.11D.2) usando anticorpos específicos contra algumas das proteínas identificadas pelos dados de espectrometria de massas que tiveram sua abundância alterada (Actina e S7) ou não (Nup95, GAPDH, Sub2 e L26) pelo nocaute. Nesta análise por *Western blot*, foram usados os extratos proteicos totais de parasitas WT e KO e, neste caso, a diminuição da expressão de proteínas observada por proteômica nos parasitas KO foi corroborada: *Western blot* apresentou menor marcação para actina (com redução de aproximadamente 70%) e proteína ribossomal S7 (redução de aproximadamente 30%), enquanto nenhuma diferença entre WT e KO foi observada para Nup95, GAPDH, Sub2 e L26, cujas abundâncias também não estavam alteradas nas análises de proteômica (Figuras 2.11D.1 e 2.11D.2).

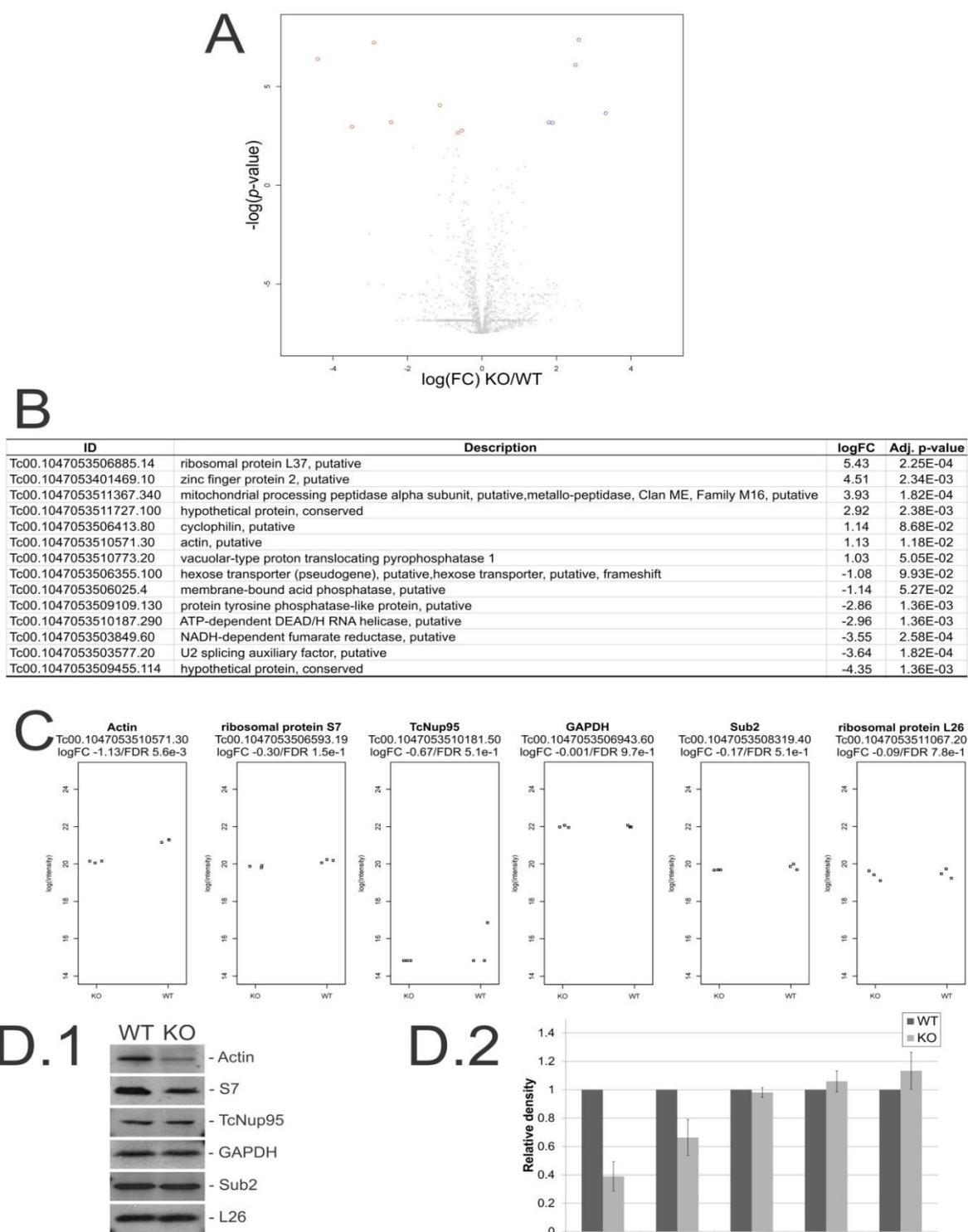


FIGURA 2.11 – PROTEÔMICA COMPARATIVA DE PARASITAS SELVAGENS E NOCAUTES. (A) Gráfico Volcano demonstrando proteínas expressas positivamente (pontos em azul) e negativamente (pontos em vermelho) nos parasitas nocautes segundo um valor de significância estatística (FDR menor ou igual a 0,01). (B) Identificação de proteínas com expressão aumentada ou diminuída no extrato total por proteômica. (C) Gráfico *Strip Chart* de intensidade das proteínas identificadas analisadas por espectrometria de massa. Cada ponto representa o valor médio de intensidade encontrado para cada réplica. FC = *Fold change*. FDR = *False Discovery Rate*. (D.1) Resultado representativo de independentes ensaios de *Western blot* e sua quantificação relativa (D.2) por densitometria normalizado por TcNup95 (Tc00.1047053510181.50); as barras indicam o erro padrão para cada proteína. Foram analisadas em C e D, os níveis proteicos de Actina (Tc00.1047053510571.30), proteína ribossomal S7 (Tc00.1047053506593.19), GAPDH (Tc00.1047053506943.60), Sub2 (Tc00.1047053508319.40), proteína ribossomal L26 (Tc00.1047053511067.20).

Apesar de um número bem reduzido, vimos que existem proteínas com a expressão significativamente alterada (Figura 2.11) e decidimos verificar se isso seria em decorrência de efeitos na tradução ou na estabilidade destes RNAs. Desse modo, primeiramente, a abundância de mRNA de algumas proteínas com a expressão diferencial no KO (Figura 2.11) foram quantificados (Figura 2.12A) e comparados por PCR em tempo real entre parasitas selvagens e nocaute. Verificamos que a quantidade de mRNA de actina (diminuição de 36%), *zinc finger protein 2* (diminuição de 20%), *mitochondrial processing peptidase alpha subunit* (diminuição de 51%), *vacuolar-type proton translocating pyrophosphatase 1* (diminuição de 40%), *U2 splicing auxiliary factor 1* (aumento de 100%), *hypothetical protein* (Tc00.1047053509455.114 – diminuição de 38%) estavam alterados (Figura 2.12A) e, alguns sem correlação com os níveis de proteína (Figura 2.11B). Além disso, Sub2, que não teve o nível proteico alterado (Figuras 2.11C e 2.11D), apresentou diminuição de 13% na quantidade de mRNA (Figura 2.12A).

Outro ponto analisado foi a presença de grânulos de mRNA nos parasitas KO que podem ser formados em situação de estresse e sequestrar RNAs impedindo sua tradução. Assim, os marcadores Dhh1 e XRNA foram testados e avaliados quanto à imunolocalização nos parasitas KO de Hel45 (Figura 2.12B). Porém, para ambos os marcadores, a localização e quantidade de grânulos se mostrou visualmente semelhante, não indicando a presença de grânulos diferenciais. Assim, os dados apresentados até o momento indicam que Hel45 pode estar envolvido no controle pós-transcricional da expressão de proteínas específicas.

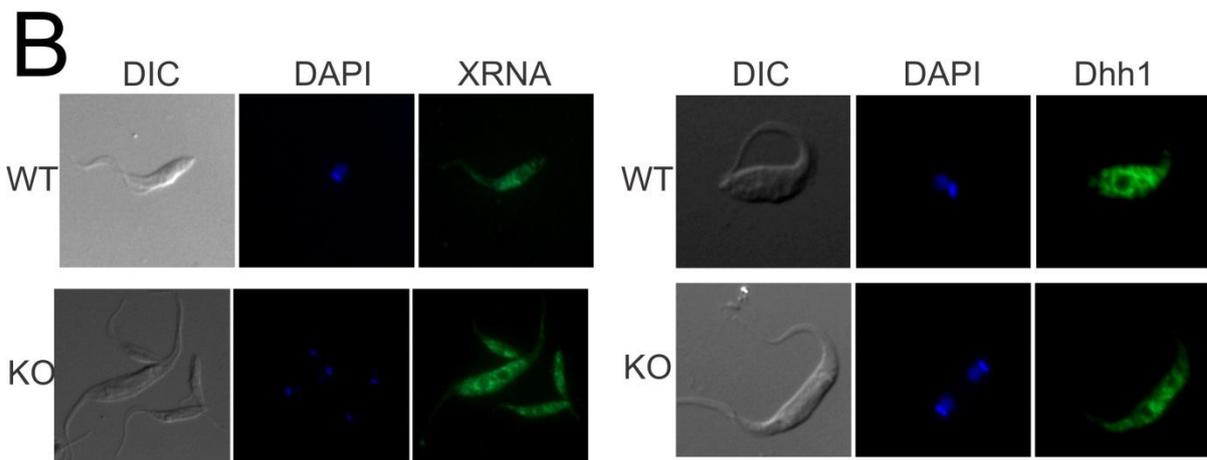
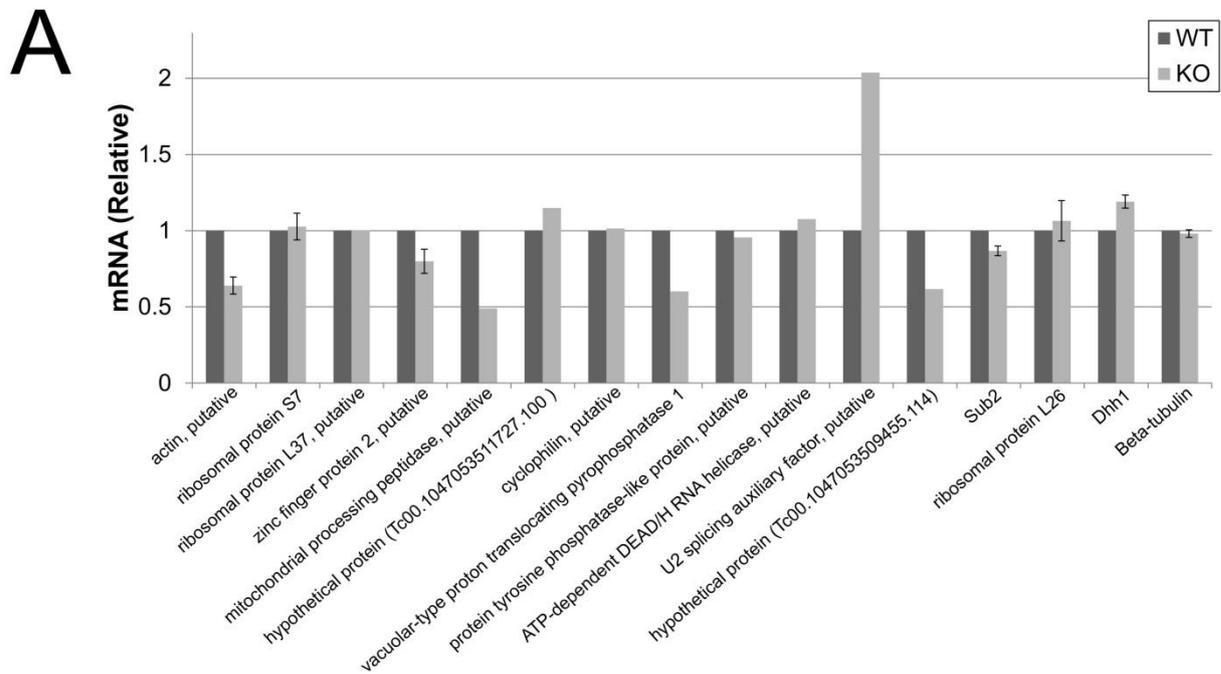


FIGURA 2.12 – QUANTIFICAÇÃO DE mRNA E AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DE GRÂNULOS EM PARASITAS NOCAUTES. (A) Análise do nível de mRNA em parasitas KO e WT por PCR quantitativo. Expressão de específicos mRNAs foram testados: Actina, S7, L37, ZFP2, *mitochondrial processing peptidase alpha subunit*, *hypothetical protein* (Tc00.1047053511727.100), *cyclophilin*, *vacuolar-type proton translocating pyrophosphatase 1*, *protein tyrosine phosphatase-like protein*, *ATP-dependent DEAD/H RNA helicase*, *U2 splicing auxiliary fator*, *hypothetical protein* (Tc00.1047053509455.114), Sub2 (Tc00.1047053508319.40), L26, Dhh1, Beta-Tubulina. Os dados representam a média e desvio padrão de três replicas ($p < 0.01$). As quantidades de mRNA foram normalizados em relação ao gene de referência gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH, Tc00.1047053506943.60). (B) Avaliação da presença de grânulos. Localização de XRNA e Dhh1 por imunofluorescência utilizando anticorpos primários específicos e secundários anti-camundongo conjugado a Alexa488. DIC = contraste por interferência diferencial. DAPI = DNA marcado com DAPI. XRNA = imunofluorescência indireta utilizando anticorpo primário anti-XRNA (1:500). Dhh1 = imunofluorescência indireta utilizando anticorpo primário Dhh1 (1:100).

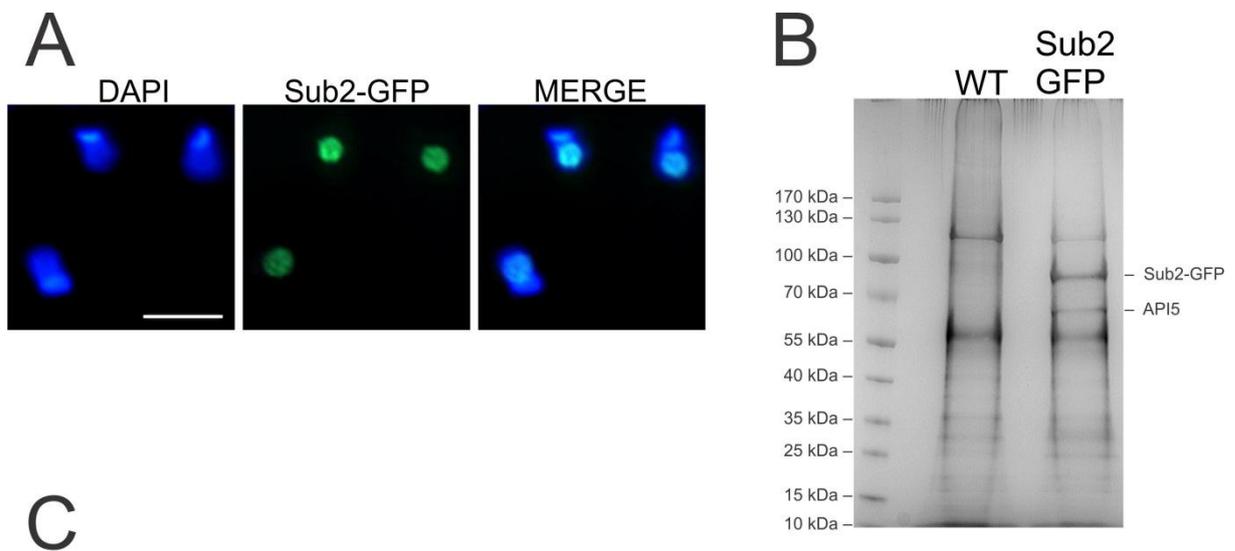
4.2.3. Identificação de complexos proteicos contendo Hel45, Sub2 e Crm1

Para ajudar a entender o papel biológico em tripanossomas investimos também na abordagem de imunoprecipitação (IP) acoplada à espectrometria de massas para a identificação dos componentes presentes em complexos proteicos contendo Hel45. Estes ensaios foram realizados em colaboração com o grupo do Dr. Mark C. Field da Universidade de Dundee, no Reino Unido. Paralelamente, foi realizada também a identificação de complexos para as proteínas Sub2 e Crm1 buscando a integração dos possíveis parceiros em comum e ajudando assim na compreensão das vias de exportação. Inicialmente, foi preciso gerar as linhagens celulares de *T. cruzi* expressando Crm1 e Hel45 fusionadas à etiqueta GFP na extremidade N-terminal. Para tanto, os genes foram clonados no vetor pTcGWGFPN (BATISTA *et al.*, 2010) para posterior transfecção de *T. cruzi*. O processo de clonagem pode ser verificado nos Apêndices A e B. A padronização dos ensaios de imunoprecipitação também pode ser conferida nos Apêndices C e E.

Esta padronização consistiu em encontrar uma condição para diminuir a quantidade de contaminantes que se ligam inespecificamente às esferas magnéticas e, principalmente, para minimizar a desagregação dos complexos proteicos durante os ensaios de imunoprecipitação. Assim, poderíamos observar qual das condições testadas apresentaria maior diferença quanto ao padrão de corrida em gel SDS-PAGE entre amostra de controle (imunoprecipitação feita com extrato de parasitas selvagem) e da proteína alvo (imunoprecipitação feita com parasitas expressando a proteína alvo conjugada a GFP). Desse modo, foram testados diferentes detergentes, sais, concentração de sal entre outros, etc para suspensão do “pó de células” (ver Materiais e Métodos) (Apêndices C e E).

A linhagem de *T. cruzi* expressando Sub2 fusionada a GFP (Figura 2.13A), descrito em Serpeloni *et al.* (2011b), foi utilizada na obtenção do extrato de proteínas que foi submetida aos ensaios de imunoprecipitação para análise do complexo contendo Sub2. Após a padronização para imunoprecipitação de Sub2 (Apêndice C), a melhor condição encontrada foi o tampão contendo baixas concentrações de sais: citrato de sódio 10mM; HEPES pH 7,4 20mM; MgCl₂ 1mM; CaCl₂ 10 μM; e CHAPS 0,1% (Asterisco vermelho no Apêndice C). Após imunoprecipitação, as amostras em solução (sem excisão de gel) provenientes diretamente da imunoprecipitação (Figuras 2.13B e 2.13C) foram analisadas por espectrometria de massas. Como esperado, a proteína Sub2 apresentou a maior abundância na amostra provenientes da IP de Sub2-GFP, ou seja, maior número de peptídeos identificados que pode ser

representado pelo maior valor de *emPAI* (ver Materiais e Métodos para descrição de *emPAI*). As proteínas hipotéticas foram analisadas pelo do programa hmmscan do pacote HMMER (EDDY, 1998) na busca de domínios conservados e, dessa forma, algumas puderam ser identificadas e nomeadas. De modo geral, apenas quatro proteínas foram obtidas nos complexos de Sub2, de acordo com o parâmetro estabelecido de maior confiança ($emPAI \geq 1,5$). Estas proteínas estão destacadas na tabela apresentada na Figura 2.13C e, a partir da análise dos domínios (dados não mostrados), estão: proteínas hipotéticas; API5 e FOP. Chaperonina, proteína tipo Alba e histona H4 apresentaram alta discrepância de *emPAI* nas réplicas (Figura 2.13C). Hel45 também foi identificada nessas análises (Figura 2.13 C), porém com baixa confiabilidade, ou seja, valor de *emPAI* de 0,53. API5 é uma proteína interessante que, em todas as réplicas, mostrou-se como a mais abundante nas IPs (depois de Sub2), correspondendo a uma banda de aproximadamente 60 kDa, visualizada em SDS-PAGE na amostra da imunoprecipitação de Sub2 (Figuras 2.13B).



Description	Average <i>emPAI</i>	SD
RNA helicase, putative OS=Trypanosoma cruzi GN=TCSYLVI0_009350 PE=4 SV=1	67.34	0.1979899
Uncharacterized protein OS=Trypanosoma cruzi Dm28c GN=TCDM_06825 PE=4 SV=1	4.04	0.9192388
Uncharacterized protein OS=Trypanosoma cruzi (strain CL Brener) GN=Tc00.1047053511807.280 PE=4 SV=1	3.85	0.8061017
Uncharacterized protein OS=Trypanosoma cruzi (strain CL Brener) GN=Tc00.1047053509033.80 PE=4 SV=1	2.15	0.5374012
Chaperonin containing t-complex protein OS=Trypanosoma cruzi Dm28c GN=TCDM_04540 PE=3 SV=1	1.9	2.3475945
Uncharacterized protein (Fragment) OS=Trypanosoma cruzi GN=TCSYLVI0_000701 PE=4 SV=1	1.885	2.6657926
Uncharacterized protein OS=Trypanosoma cruzi (strain CL Brener) GN=Tc00.1047053506435.150 PE=4 SV=1	1.875	0.2192031
Histone H4 OS=Trypanosoma cruzi (strain CL Brener) GN=Tc00.1047053507941.150 PE=3 SV=1	1.535	1.2657211
Uncharacterized protein OS=Trypanosoma cruzi Dm28c GN=TCDM_07317 PE=4 SV=1	1.335	0.5444722
60S ribosomal protein L30, putative OS=Trypanosoma cruzi (strain CL Brener) GN=Tc00.1047053503453.40 PE=4 SV=1	1.07	1.5132085
Ribosomal protein L38, putative OS=Trypanosoma cruzi (strain CL Brener) GN=Tc00.1047053503881.39 PE=3 SV=1	0.975	0.7141778
40S ribosomal protein S2, putative (Fragment) OS=Trypanosoma cruzi marinkellei GN=MOQ_008343 PE=3 SV=1	0.755	0.0919239
Ribosomal protein S20, putative OS=Trypanosoma cruzi (strain CL Brener) GN=Tc00.1047053508475.10 PE=3 SV=1	0.74	1.4849242
60S ribosomal protein L18 OS=Trypanosoma cruzi (strain CL Brener) GN=RPL18 PE=3 SV=1	0.68	0.6505382
Protein kinase A catalytic subunit isoform 2, putative OS=Trypanosoma cruzi (strain CL Brener) GN=Tc00.1047053508461.280 PE=4 SV=1	0.675	0.0919239
Retrotransposon hot spot (RHS) protein, putative (Fragment) OS=Trypanosoma cruzi GN=TCSYLVI0_000151 PE=4 SV=1	0.67	0.2969848
Histone H3, putative OS=Trypanosoma cruzi (strain CL Brener) GN=Tc00.1047053505931.50 PE=4 SV=1	0.66	0.5656854
ATP-dependent RNA helicase, putative OS=Trypanosoma cruzi GN=TCSYLVI0_006093 PE=3 SV=1	0.65	0.5374012
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase OS=Trypanosoma cruzi GN=TCSYLVI0_003325 PE=3 SV=1	0.585	0.205061
60S ribosomal protein L7, putative OS=Trypanosoma cruzi marinkellei GN=MOQ_001105 PE=3 SV=1	0.57	0.8061017
ATP-dependent DEAD/H RNA helicase, putative OS=Trypanosoma cruzi marinkellei GN=MOQ_001322 PE=3 SV=1	0.535	0.106066
RNA-binding protein, putative OS=Trypanosoma cruzi GN=TCSYLVI0_000443 PE=4 SV=1	0.53	1.046518
Ubiquitin-60S ribosomal protein L40 OS=Trypanosoma cruzi GN=FUS1 PE=2 SV=2	0.485	0.6858936
Mago nashi-like protein, putative OS=Trypanosoma cruzi (strain CL Brener) GN=Tc00.1047053506945.200 PE=4 SV=1	0.475	0.1626346

FIGURA 2.13 – COMPONENTES PROTEICOS DOS COMPLEXOS CONTENDO Sub2 DE *Trypanosoma cruzi*. (A) Localização de Sub2 fusionada a GFP. DAPI = DNA marcado com DAPI. Sub2-GFP = Sub2 localizada por fluorescência de GFP. MERGE = colocação de imagens para DAPI e Sub2-GFP. Barra = 5 μ m. (B) Perfil eletroforético em gel gradiente de poliacrilamida 4–12% NuPAGE Novex Bis-Tris precast (Life technologies) corado com o kit SilverQuest™ Silver Staining (Life technologies) de imunoprecipitação utilizando extrato proteico de parasitas selvagens (WT) e expressando a proteína fusionada (Sub2-GFP) e esferas magnéticas conjugadas com *nanobodies* anti-GFP. Marcador = PageRuler Prestained Protein Ladder (de 10 a 170 kDa) (Thermo Fisher Scientific). (C) Proteínas identificadas associadas a Sub2, segundo valores estaticamente significativos de $p < 0,05$. O valor de *emPAI* indica o índice de abundância de cada proteína no imunoprecipitado subtraído do valor referente encontrado no controle. SD indica o desvio padrão de *emPAI* entre as réplicas técnicas. As proteínas com valor de *emPAI* $\geq 1,5$ estão destacadas na tabela e, em negrito, estão Hel45, Sub2, API5, FOP e duas proteínas hipotéticas.

Podemos afirmar que se tratava de API5, pois esta banda foi excisada do gel, submetida à análise por espectrometria de massas, neste caso, esta proteína foi identificada novamente com alto valor de *emPAI* (Apêndice D). API5 é uma proteína anotada como hipotética nos bancos de dados (número de identificação Tc00.1047053511807.280) com massa predita de 61 kDa. Utilizando a ferramenta HMMER (EDDY, 1998), foi encontrado um domínio API5 (API5 – *apoptosis inhibitory protein 5*) (Figura 2.14A) e, desse modo, essa proteína passou a ser denominada genericamente de TcAPI5. API5 de humanos é uma proteína anti-apoptótica superexpressa em células cancerígenas e rica em repetições HEAT e ARM (HAN *et al.*, 2012). Essas repetições ARM foram observadas em TcAPI5 (Figuras 2.14A e 2.14C) e são características de proteínas como β -catenina e importinas (SAMUEL *et al.*, 2006; TEWARI *et al.*, 2010). Além disso, utilizando a ferramenta PHYRE2 (KELLEY & STERNBERG, 2009) foi possível prever as estruturas secundária (Figura 2.14B) e terciária (Figura 2.14C) de TcAPI5 que também mostrou similaridade com as proteínas Symplekin e Importina-beta. Symplekin de humanos, está envolvida no processamento de pré-mRNA por poliadenilação e clivagem na extremidade 3' (HOFMANN *et al.*, 2002), além de participar da iniciação e terminação da transcrição da RNA pol II em humanos (XIANG *et al.*, 2010). Em *Oriza sativa*, API5 interage com Sub2/UAP56 (LI *et al.*, 2011) e Acinus (EJC) (RIGOU *et al.*, 2009), porém o papel dessas interações, até o momento, ainda é incerto.

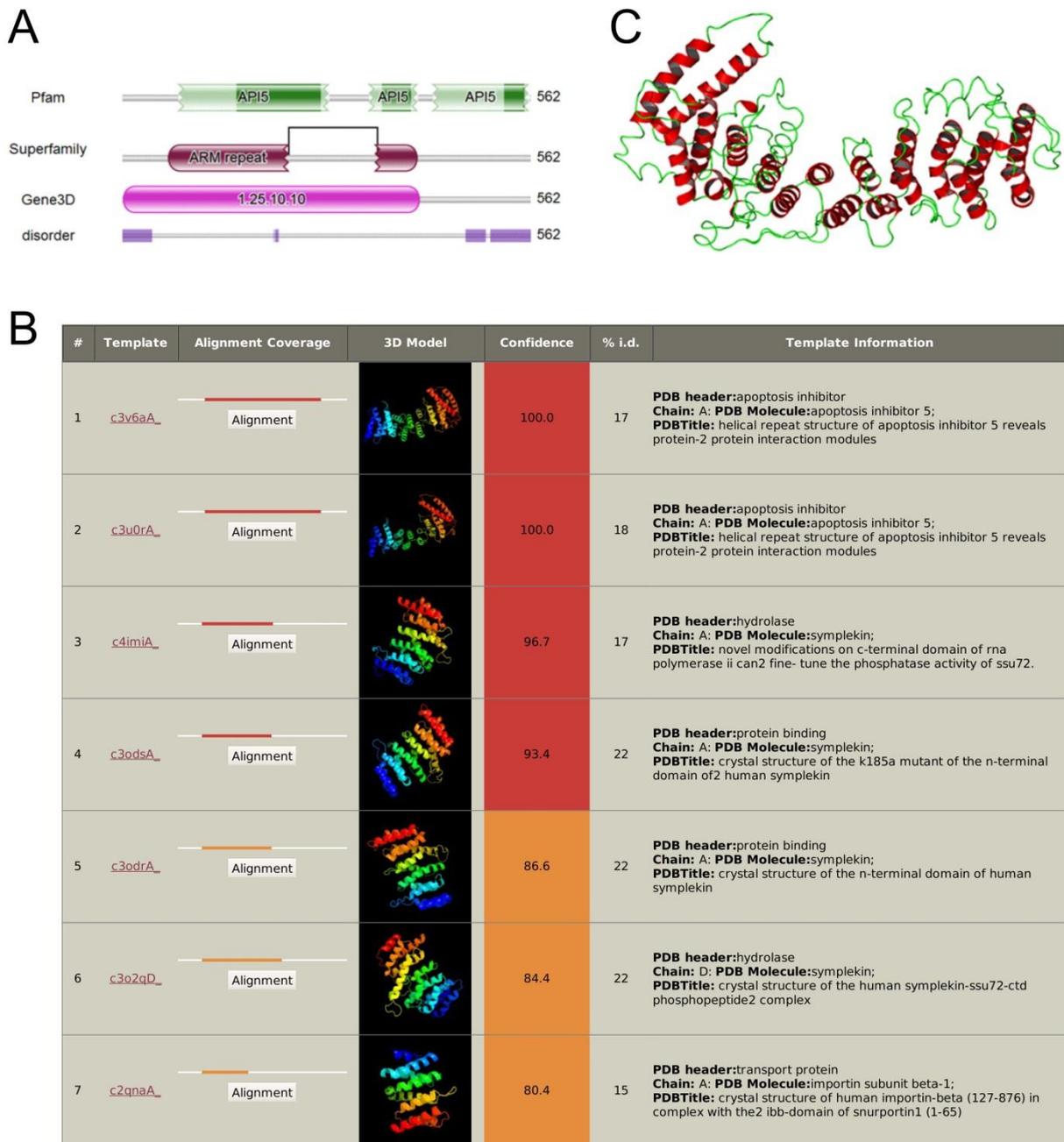
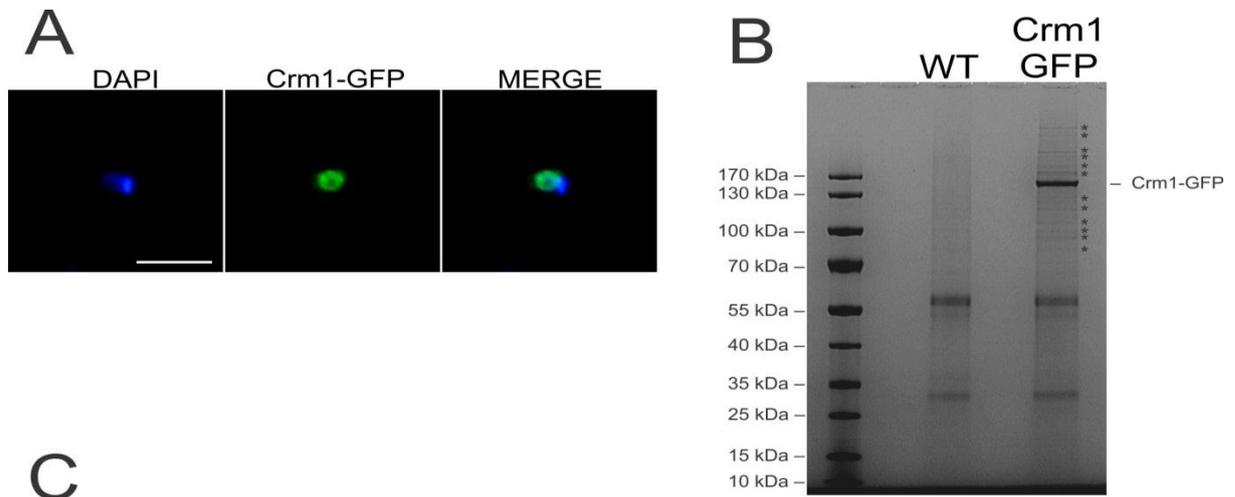


FIGURA 2.14 – DOMÍNIOS FUNCIONAIS DE API5 DE *Trypanosoma cruzi*. (A) Identificação de domínios funcionais de TcAPI5 através do programa hmmscan do pacote HMMER (EDDY, 1998): o domínio API5, a partir de buscas nos bancos de dados do Pfam; repetições ARM, o que inclui esta proteína na superfamília 1.25.10.10. (B) Identificação de domínios e (C) Predição por homologia estrutural de TcAPI5 através do programa Phyre2 (KELLEY & STERNBERG, 2009), utilizado para predição estrutural baseado na conservação de estrutura secundária: TcAPI5 apresentou similaridade às proteínas API5, Symplekin e Importina-beta. As repetições ARM (C, em vermelho) estão destacadas.

Apesar dos dados de tratamento com leptomicina B indicarem que Hel45 não é exportado do núcleo por Crm1 (Figura 6A, Capítulo1), achamos interessante verificar quais proteínas estavam presentes no complexo de Crm1, para reforçar ou refutar esta hipótese. Assim, foi gerado o transfectante expressando a proteína Crm1 fusionada à GFP que apresentou localização nuclear (Figura 2.15A). Na análise de toda amostra em solução de imunoprecipitação, conforme esperado, Crm1 foi a proteína com a maior abundância, representado pelo alto valor de *emPAI* (Figura 2.15C). A alíquota dessa amostra quando analisada em SDS-PAGE mostra uma banda bem intensa com massa aproximada ao valor predito de 150 kDa que corresponde ao tamanho da proteína fusionada à GFP (Figura 2.15B). A estabilização dos complexos de Crm1 foi alcançada em condição de alto sal (Apêndice C) (citrato de sódio 250 mM; Hepes pH 7,4 20 mM; MgCl₂ 1 mM; CaCl₂ 10 µM; e CHAPS 0,1%). Neste caso, ao compararmos o perfil de proteínas em SDS-PAGE entre as amostras de IP de controle e da proteína alvo foi possível verificar que presença de diversas bandas diferentes na região do gel correspondente a proteínas de alto peso molecular (destacadas em asterisco na Figura 2.15B). Um dado bastante interessante foi a presença de diversas Nucleoporinas no imunoprecipitado de Crm1 (em negrito na Figura 2.15C): Nup93 (TcNup96), Nup84/100 (ortólogo de TbNup89); Nup-1; Mlp-1; Nup133/155 (TcNup147); Nup109 (ortólogo de TbNup109), ortólogos de TbNup82, TbNup132, TbNup181 e TbNup225; algumas Nups FG (NSP1/Nup62 (ortólogo de TbNup53a); Nup54/57(ortólogo de TbNup53b); Nup96/98 (ortólogo de TbNup158); TbNup64; TbNup149. Além disso, Crm1 interage com fatores solúveis que estão associados a nucleoporinas (também em negrito na Figura 2.15C), como Ran que é a GTPase que fornece o gradiente de GTP para o transporte de cargas, o ortólogo de Gle2 (anotado com *poly(A) export protein*) e Sec13. Outras proteínas, algumas anotadas como hipotéticas, também foram identificadas nesses complexos de Crm1 (Figura 2.15C). Esse resultado indica que o receptor Crm1 de *T. cruzi* pode ser funcional no transporte, porém a interação pode ser bastante dinâmica e transiente, o que impossibilita a identificação de cargas nesse tipo de ensaio.

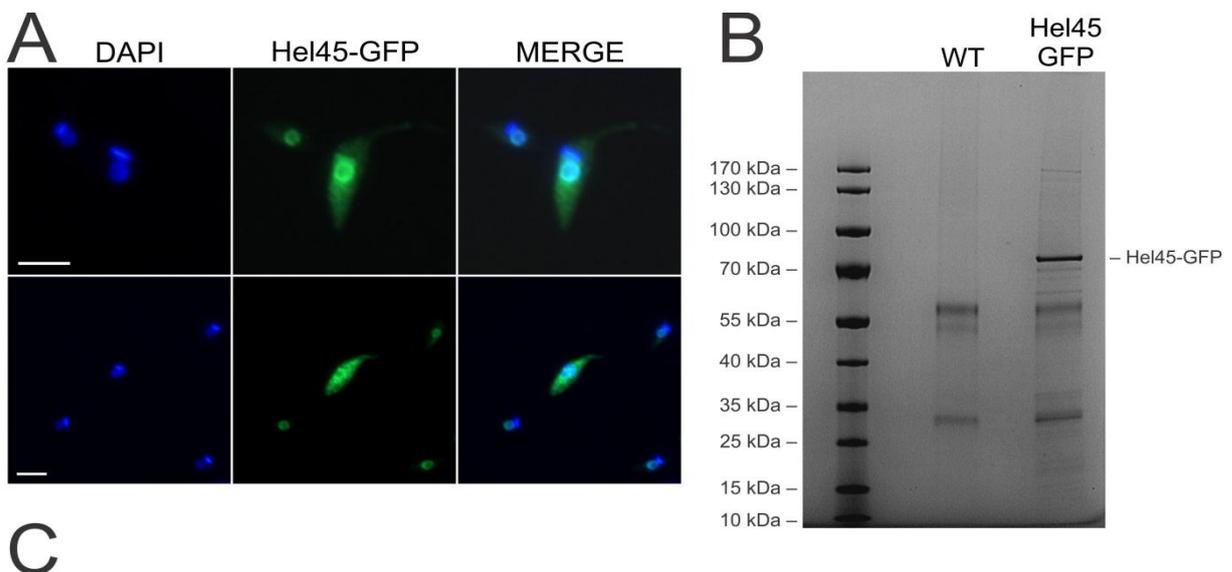


Description	Average <i>empAI</i>	Protein
Exportin 1, putative, RNA-nuclear export factor, putative OS=Trypanosoma cruzi GN=TCSYLVIO_004194 PE=4 SV=1	51.28	Crm1
Exportin 1, putative OS=Trypanosoma cruzi (strain CL Brener) GN=Tc00.1047053511725.150 PE=4 SV=1	20.41	
Chaperonin HSP60, mitochondrial, putative OS=Trypanosoma cruzi marinkellei GN=MOQ_003716 PE=3 SV=1	4.86	Chaperonin HSP60
Nucleoporin interacting component (NUP93) OS=Trypanosoma cruzi Dm28c GN=TCDM_08273 PE=4 SV=1	3.35	Nup93 (TcNup96)
Poly(A) export protein, putative OS=Trypanosoma cruzi GN=TCSYLVIO_003454 PE=4 SV=1	3.27	Gle2
Nucleoporin (NUP54/57), putative (Fragment) OS=Trypanosoma cruzi GN=TCSYLVIO_002779 PE=4 SV=1	3.23	Nup54/57
GTP-binding nuclear protein rtb2, putative OS=Trypanosoma cruzi GN=TCSYLVIO_006267 PE=4 SV=1	3.2	Ran
Calcium-transporting ATPase OS=Trypanosoma cruzi GN=TCSYLVIO_010545 PE=3 SV=1	2.69	calcium-translocating P-type ATPase
Calcium-transporting ATPase OS=Trypanosoma cruzi Dm28c GN=TCDM_06126 PE=3 SV=1	2.59	
Uncharacterized protein OS=Trypanosoma cruzi GN=TCSYLVIO_005610 PE=4 SV=1	2.5	
Uncharacterized protein (Fragment) OS=Trypanosoma cruzi (strain CL Brener) GN=Tc00.1047053503887.10 PE=4 SV=1	1.91	Nup84/Nup100(TbNup89)
NUP-1 protein, putative (Fragment) OS=Trypanosoma cruzi GN=TCSYLVIO_008806 PE=4 SV=1	2.41	Nup-1
Uncharacterized protein OS=Trypanosoma cruzi GN=TCSYLVIO_001341 PE=4 SV=1	2.37	(TbNup82)
Uncharacterized protein OS=Trypanosoma cruzi Dm28c GN=TCDM_04830 PE=4 SV=1	2.36	
Uncharacterized protein OS=Trypanosoma cruzi GN=TCSYLVIO_002947 PE=4 SV=1	2.19	(TbNup64)
Uncharacterized protein OS=Trypanosoma cruzi (strain CL Brener) GN=Tc00.1047053504411.10 PE=4 SV=1	0.93	
Uncharacterized protein OS=Trypanosoma cruzi GN=TCSYLVIO_002713 PE=4 SV=1	2.29	(TbNup149)
Nucleoporin OS=Trypanosoma cruzi Dm28c GN=TCDM_01956 PE=4 SV=1	2.16	Nup96/Nup98 (TbNup158)
Dehydrogenase OS=Trypanosoma cruzi PE=4 SV=1	2.15	PGFS
Uncharacterized protein OS=Trypanosoma cruzi GN=TCSYLVIO_004056 PE=4 SV=1	2.06	NSP1/Nup62 (TbNup53a)
Uncharacterized protein OS=Trypanosoma cruzi Dm28c GN=TCDM_07245 PE=4 SV=1	2.04	Uncharacterized
40S ribosomal protein S3a-1 OS=Trypanosoma cruzi (strain CL Brener) GN=Tc00.1047053503635.59 PE=3 SV=1	2.01	S3a-1
Protein transport protein Sec13, putative OS=Trypanosoma cruzi GN=TCSYLVIO_006131 PE=4 SV=1	1.9	Sec13
Nucleoporin, putative OS=Trypanosoma cruzi GN=TCSYLVIO_004586 PE=4 SV=1	1.59	Nup133/Nup155 (TcNup147)
T-complex protein 1 subunit alpha OS=Trypanosoma cruzi GN=TCSYLVIO_005312 PE=3 SV=1	1.5	(TCP-1-alpha)
Cytochrome b5-like, putative OS=Trypanosoma cruzi (strain CL Brener) GN=Tc00.1047053506753.110 PE=3 SV=1	1.49	Cytochrome b5-like
Uncharacterized protein OS=Trypanosoma cruzi Dm28c GN=TCDM_07836 PE=4 SV=1	1.43	(TbNup149)
Uncharacterized protein OS=Trypanosoma cruzi Dm28c GN=TCDM_06816 PE=4 SV=1	1.42	
Uncharacterized protein OS=Trypanosoma cruzi GN=TCSYLVIO_001180 PE=4 SV=1	1.35	(TbNup132)
Uncharacterized protein OS=Trypanosoma cruzi (strain CL Brener) GN=Tc00.1047053447255.10 PE=4 SV=1	1.36	DoxX
40S ribosomal protein S3, putative OS=Trypanosoma cruzi GN=TCSYLVIO_000304 PE=3 SV=1	1.35	S3
Uncharacterized protein OS=Trypanosoma cruzi GN=TCSYLVIO_010662 PE=4 SV=1	1.35	Nup54/57 (TbNup53b)
Chaperonin containing t-complex protein, putative OS=Trypanosoma cruzi GN=TCSYLVIO_005500 PE=3 SV=1	1.33	T-complex protein 1, beta subunit
Uncharacterized protein OS=Trypanosoma cruzi Dm28c GN=TCDM_02035 PE=4 SV=1	1.31	Mip-1 (TbMip-1)
40S ribosomal protein S2, putative (Fragment) OS=Trypanosoma cruzi marinkellei GN=MOQ_008343 PE=3 SV=1	1.3	S2
Uncharacterized protein OS=Trypanosoma cruzi GN=TCSYLVIO_000008 PE=4 SV=1	1.29	Uncharacterized
Uncharacterized protein OS=Trypanosoma cruzi GN=TCSYLVIO_006830 PE=4 SV=1	1.26	Uncharacterized
40S ribosomal protein S11, putative OS=Trypanosoma cruzi (strain CL Brener) GN=Tc00.1047053511139.20 PE=3 SV=1	1.24	S11
Uncharacterized protein OS=Trypanosoma cruzi Dm28c GN=TCDM_05787 PE=4 SV=1	1.22	Nup109 (TbNup109)
60S ribosomal protein L2, putative OS=Trypanosoma cruzi marinkellei GN=MOQ_007971 PE=4 SV=1	1.2	L2
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase OS=Trypanosoma cruzi GN=TCSYLVIO_003325 PE=3 SV=1	1.16	GAPDH
Uncharacterized protein OS=Trypanosoma cruzi Dm28c GN=TCDM_02918 PE=4 SV=1	1.15	DCF-1
Uncharacterized protein OS=Trypanosoma cruzi Dm28c GN=TCDM_07114 PE=4 SV=1	1.08	Uncharacterized
Uncharacterized protein OS=Trypanosoma cruzi Dm28c GN=TCDM_08956 PE=4 SV=1	1.07	Uncharacterized
Uncharacterized protein OS=Trypanosoma cruzi GN=TCSYLVIO_007091 PE=4 SV=1	1.06	Uncharacterized
Uncharacterized protein OS=Trypanosoma cruzi (strain CL Brener) GN=Tc00.1047053506989.250 PE=4 SV=1	0.98	Uncharacterized
Uncharacterized protein OS=Trypanosoma cruzi Dm28c GN=TCDM_03653 PE=4 SV=1	0.96	Nup53/35/40-type RNA recognition motif
Uncharacterized protein OS=Trypanosoma cruzi Dm28c GN=TCDM_03480 PE=4 SV=1	0.95	(TbNup181)
Uncharacterized protein OS=Trypanosoma cruzi GN=TCSYLVIO_003915 PE=4 SV=1	0.94	(TbNup225)

FIGURA 2.15 – COMPONENTES PROTEICOS DOS COMPLEXOS CONTENDO Crm1 DE *Trypanosoma cruzi*. (A) Localização de Crm1 fusionada a GFP. DAPI = DNA marcado com DAPI. Crm1-GFP = Crm1 localizada por fluorescência de GFP. MERGE = colocação de imagens para DAPI e Crm1-GFP. Barra = 5 μm. (B) Perfil eletroforético em gel gradiente de poli-acrilamida 4–12% NuPAGE Novex Bis-Tris precast (Life technologies) corado com o kit SilverQuest™ Silver Staining (Life technologies) de imunoprecipitação utilizando extrato proteico de parasitas selvagens (WT) e expressando a proteína fusionada (Crm1-GFP) e esferas magnéticas conjugadas com *nanobodies* anti-GFP. Marcador = PageRuler Prestained Protein Ladder (de 10 a 170 kDa) (Thermo Fisher Scientific). (C) Proteínas identificadas associadas a Crm1, segundo valores estaticamente significativos de $p < 0,05$. O valor de *empAI* indica o índice de abundância de cada proteína no imunoprecipitado subtraído do valor referente encontrado no controle. As proteínas com valor de *empAI* ≥ 1.5 estão destacadas na tabela e, em negrito, estão destacadas Crm1, Nups e proteínas associadas a Nups.

A localização de Hel45 fusionada a GFP na extremidade N-terminal foi um pouco diferente daquela obtida por imunolocalização para a proteína detectada tanto com anticorpo anti-Hel45 e quanto com anticorpo anti-etiqueta PTP (Figuras 3B e 4A, Capítulo1). Neste caso, foi observado que GFP-Hel45 apresentou localização enriquecida no núcleo, mas com marcação citoplasmática em algumas células (Figura 2.16A), provavelmente por se tratar de uma população e não clone de transfectantes. De qualquer forma, esta população foi utilizada para obtenção dos extratos usados nos ensaios de imunoprecipitação dos complexos de Hel45. As condições padronizadas (Apêndice E) para a abordagem proteômica foram: citrato de sódio 50mM; Hepes pH 7,4 20mM; MgCl₂ 1mM; CaCl₂ 10 μM e TritonX-100 0,1%. Assim, como nos casos anteriores, a proteína Hel45 apresentou o maior valor de *emPAI* nas amostras provenientes da proteína alvo (fusionada a GFP) pelas análises dos dados de espectrometria de massas. Vale ressaltar, que uma alíquota desta amostra também foi analisada por SDS-PAGE e foi possível observar a presença de uma banda específica e com alta intensidade de tamanho aproximado de 70 kDa que corresponde ao tamanho de GFP-Hel45. Nas análises de proteômica, além da Hel45, também foram identificadas algumas proteínas relacionadas ao metabolismo de mRNA (destacadas em negrito na Figura 2.16C), como por exemplo: proteína de ligação a RNA DRBD2 e DRDB1, proteínas com domínio Alba, PABP1 e UBP-2. A presença de Mago (com *emPAI*≥1,5) e Y14 (*emPAI*<1,5) foi bastante interessante (Figura 2.16C), demonstrando a possível interação com proteínas de EJC. Apesar do baixo valor de *emPAI* para Sub2, a coimunoprecipitação é um indicativo que essa proteína possa estar interagindo com Hel45.

Outra proteína identificada com alto valor de confiabilidade (*emPAI*≥1,5) foi uma anotada como hipotética (Figura 2.16C) nos bancos de dados, com massa molecular de 60 kDa (Tc00.1047053511367.220), mas que apresenta o domínio NTF2 (desse modo, denominamos por proteína NTF2-like) em sua porção N-terminal (Figura 2.17). Em outros organismos, este domínio NTF2-like está presente em fatores de exportação de mRNA como a Mex67 de mamíferos e atua interagindo com Nups FG durante o transporte (FRIBOURG *et al.*, 2001).



Description	Average emPAI	Protein
ATP-dependent DEAD/H RNA helicase, putative OS=Trypanosoma cruzi (strain CL Brener) GN=Tc00.1047053506587.40 PE=3 SV=1	48.14	Hel45
40S ribosomal protein S4 OS=Trypanosoma cruzi (strain CL Brener) GN=Tc00.1047053509683.117 PE=3 SV=1	12.06	S4
RNA-binding protein, putative OS=Trypanosoma cruzi GN=TCSYLVI0_001364 PE=4 SV=1	5.76	DRBD2
Uncharacterized protein OS=Trypanosoma cruzi Dm28c GN=TCDM_04668 PE=4 SV=1	4.98	NTF2-like
Uncharacterized protein OS=Trypanosoma cruzi (strain CL Brener) GN=Tc00.1047053511367.220 PE=4 SV=1	2.82	
Uncharacterized protein (Fragment) OS=Trypanosoma cruzi GN=TCSYLVI0_000701 PE=4 SV=1	4.51	ALBA3/ALBA4
Uncharacterized protein OS=Trypanosoma cruzi GN=TCSYLVI0_001330 PE=4 SV=1	4.44	RNA 3'-terminal phosphate cyclase
40S ribosomal protein S6 OS=Trypanosoma cruzi GN=TCSYLVI0_001068 PE=3 SV=1	4.39	S6
Uncharacterized protein OS=Trypanosoma cruzi (strain CL Brener) GN=Tc00.1047053503833.50 PE=4 SV=1	3.93	Tc38
60S ribosomal protein L28, putative OS=Trypanosoma cruzi (strain CL Brener) GN=Tc00.1047053506297.270 PE=4 SV=1	3.24	L28
Poly(A)-binding protein, putative, polyadenylate-binding protein, putative OS=Trypanosoma cruzi marinkellei GN=MOQ_004370 PE=4 SV=1	3.14	PABP1
Uncharacterized protein OS=Trypanosoma cruzi GN=TCSYLVI0_002627 PE=4 SV=1	2.97	P-loop containing nucleoside triphosphate hydrolases
Uncharacterized protein OS=Trypanosoma cruzi Dm28c GN=TCDM_07080 PE=4 SV=1	2.77	L4
60S ribosomal protein L4, putative OS=Trypanosoma cruzi (strain CL Brener) GN=Tc00.1047053504121.30 PE=4 SV=1	2.53	cytosolic leucyl aminopeptidase
Aminopeptidase OS=Trypanosoma cruzi Dm28c GN=TCDM_05225 PE=4 SV=1	2.23	UBP-2
U-rich RNA-binding protein UBP-2 OS=Trypanosoma cruzi (strain CL Brener) GN=Tc00.1047053507093.229 PE=4 SV=1	2.08	S8
40S ribosomal protein S8 OS=Trypanosoma cruzi GN=TCSYLVI0_001300 PE=3 SV=1	2.02	L12
60S ribosomal protein L12, putative OS=Trypanosoma cruzi (strain CL Brener) GN=Tc00.1047053504037.30 PE=3 SV=1	2.01	PGFS
Prostaglandin F2alpha synthase OS=Trypanosoma cruzi (strain CL Brener) GN=Tc00.1047053508461.80 PE=4 SV=1	1.93	DRDB1
RNA-binding protein, putative (Fragment) OS=Trypanosoma cruzi GN=TCSYLVI0_010185 PE=4 SV=1	1.82	Uncharacterized
Uncharacterized protein OS=Trypanosoma cruzi GN=TCSYLVI0_002331 PE=4 SV=1	1.78	FOP (Friend of PRMT1)
Uncharacterized protein OS=Trypanosoma cruzi (strain CL Brener) GN=Tc00.1047053509033.80 PE=3 SV=1	1.58	P2
60S acidic ribosomal protein P2, putative OS=Trypanosoma cruzi (strain CL Brener) GN=Tc00.1047053505977.26 PE=3 SV=1	1.55	AS
40S ribosomal protein SA OS=Trypanosoma cruzi marinkellei GN=MOQ_007211 PE=3 SV=1	1.54	Mago
Mago nashi-like protein, putative OS=Trypanosoma cruzi (strain CL Brener) GN=Tc00.1047053506945.200 PE=4 SV=1	1.54	P0
60S acidic ribosomal protein P0 OS=Trypanosoma cruzi GN=TCSYLVI0_005515 PE=3 SV=1	1.5	Uncharacterized
Uncharacterized protein OS=Trypanosoma cruzi (strain CL Brener) GN=Tc00.1047053506435.150 PE=4 SV=1	1.3	Prp19
Uncharacterized protein OS=Trypanosoma cruzi GN=TCSYLVI0_003504 PE=4 SV=1	1.29	S19
40S ribosomal protein S17, putative OS=Trypanosoma cruzi (strain CL Brener) GN=Tc00.1047053508827.79 PE=3 SV=1	1.28	L37a
60S ribosomal protein L37a, putative OS=Trypanosoma cruzi (strain CL Brener) GN=Tc00.1047053504069.56 PE=3 SV=1	1.28	L13
Ribosomal protein L13 OS=Trypanosoma cruzi Dm28c GN=TCDM_02783 PE=3 SV=1	1.25	P1
60S acidic ribosomal protein P1 OS=Trypanosoma cruzi PE=3 SV=1	1.23	I36
60S ribosomal protein I36, putative OS=Trypanosoma cruzi (strain CL Brener) GN=Tc00.1047053510767.20 PE=4 SV=1	1.2	H3
Histone H3, putative OS=Trypanosoma cruzi (strain CL Brener) GN=Tc00.1047053505931.50 PE=4 SV=1	1.2	HSP70
Heat shock protein 70 OS=Trypanosoma cruzi GN=HSP70 PE=3 SV=1	1.16	RHS
Retrotransposon hot spot (RHS) protein OS=Trypanosoma cruzi Dm28c GN=TCDM_02054 PE=4 SV=1	1.16	S15
40S ribosomal protein S15, putative OS=Trypanosoma cruzi (strain CL Brener) GN=Tc00.1047053511809.130 PE=3 SV=1	1.14	L27
Ribosomal protein L27, putative OS=Trypanosoma cruzi (strain CL Brener) GN=Tc00.1047053511545.40 PE=4 SV=1	1.13	L7
60S ribosomal protein L7, putative OS=Trypanosoma cruzi marinkellei GN=MOQ_001105 PE=3 SV=1	1.12	L30
60S ribosomal protein L30, putative OS=Trypanosoma cruzi (strain CL Brener) GN=Tc00.1047053503453.40 PE=4 SV=1	1.09	Uncharacterized
Uncharacterized protein OS=Trypanosoma cruzi Dm28c GN=TCDM_08375 PE=4 SV=1	1.09	L23a
60S ribosomal protein L23a, putative OS=Trypanosoma cruzi (strain CL Brener) GN=Tc00.1047053508175.146 PE=3 SV=1	1.02	SmdD3
Small nuclear ribonucleoprotein SmdD3, putative OS=Trypanosoma cruzi (strain CL Brener) GN=Tc00.1047053508257.150 PE=4 SV=1	1.01	L38
Ribosomal protein L38, putative OS=Trypanosoma cruzi (strain CL Brener) GN=Tc00.1047053509351.4 PE=3 SV=1	0.94	Nop5
Nucleolar protein, putative OS=Trypanosoma cruzi GN=TCSYLVI0_007036 PE=4 SV=1	0.93	Alba1
Uncharacterized protein OS=Trypanosoma cruzi (strain CL Brener) GN=Tc00.1047053504001.10 PE=4 SV=1	0.92	S18
40S ribosomal protein S18, putative OS=Trypanosoma cruzi (strain CL Brener) GN=Tc00.1047053506679.100 PE=3 SV=1	0.92	Uncharacterized
Uncharacterized protein OS=Trypanosoma cruzi GN=TCSYLVI0_006342 PE=4 SV=1	0.92	S10
40S ribosomal protein S10, putative OS=Trypanosoma cruzi (strain CL Brener) GN=Tc00.1047053506679.140 PE=4 SV=1	0.91	S6
Ribosomal protein S6, putative OS=Trypanosoma cruzi (strain CL Brener) GN=Tc00.1047053508277.120 PE=4 SV=1	0.91	Repetitive protein antigen 1
Repetitive protein antigen 1 (Fragment) OS=Trypanosoma cruzi PE=4 SV=1	0.9	Sub2
RNA helicase, putative OS=Trypanosoma cruzi GN=TCSYLVI0_009350 PE=4 SV=1	0.85	DRDB3
Uncharacterized protein OS=Trypanosoma cruzi GN=TCSYLVI0_004216 PE=4 SV=1	0.61	Dhh1
ATP-dependent DEAD/H RNA helicase, putative OS=Trypanosoma cruzi marinkellei GN=MOQ_003828 PE=3 SV=1	0.54	Y14
Uncharacterized protein OS=Trypanosoma cruzi (strain CL Brener) GN=Tc00.1047053508213.40 PE=4 SV=1	0.38	

FIGURA 2.16 – COMPONENTES PROTEICOS DOS COMPLEXOS CONTENDO Hel45 DE *Trypanosoma cruzi*. (A) Localização de Hel45 fusionada a GFP. DAPI = DNA marcado com DAPI. Hel45-GFP = Hel45 localizada por fluorescência de GFP. MERGE = colocalização de imagens para DAPI e Hel45-GFP. Barra = 5 μ m. (B) Perfil eletroforético em gel gradiente de poliacrilamida 4–12% NuPAGE Novex Bis-Tris precast (Life technologies) corado com o kit SilverQuest™ Silver Staining (Life technologies) de imunoprecipitação utilizando extrato proteico de parasitas selvagens (WT) e expressando a proteína fusionada (Hel45-GFP) e esferas magnéticas conjugadas com *nanobodies* anti-GFP. Marcador = PageRuler Prestained Protein Ladder (de 10 a 170 kDa) (Thermo Fisher Scientific). (C) Proteínas identificadas associadas a Hel45, segundo valores estaticamente significativos de $p < 0,05$. O valor de *emPAI* indica o índice de abundância de cada proteína no imunoprecipitado subtraído do valor referente encontrado no controle. As proteínas com valor de *emPAI* $\geq 1,5$ estão destacadas na tabela. Em negrito, estão algumas proteínas que podem estar relacionadas ao metabolismo de mRNA.

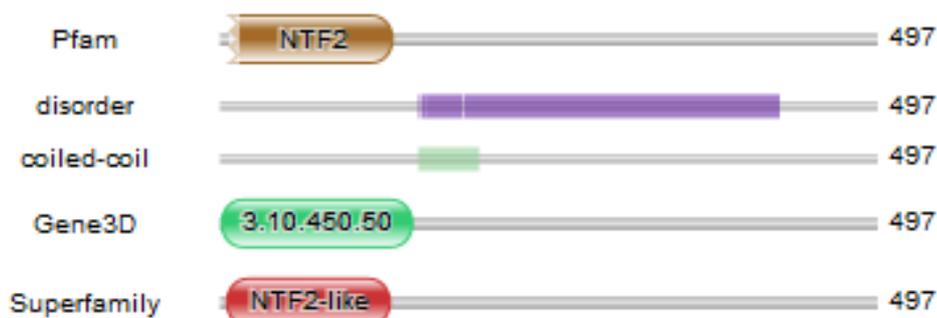


FIGURA 2.17 – DOMÍNIO FUNCIONAL DE PROTEÍNA CONTENDO DOMÍNIO NTF2-like DE *Trypanosoma cruzi*. (A) Identificação de domínios funcionais da proteína NTF2-like através do programa hmmscan do pacote HMMER (EDDY, 1998): o domínio NTF2 na extremidade N-terminal, que determina essa proteína como pertencente a superfamília 3.10.450.50, com e-valor de $7.5E-10$ entre os aminoácidos 10 e 133.

Na busca de ortólogos, foi utilizada a ferramenta Blastp (ALTSCHUL *et al.*, 1997) utilizando como *query* a sequência da proteína de NTF2-like de *T. cruzi* a partir do critério de *reciprocal best hit*, E-values menores que 10^{-5} e cobertura acima de 30%. Dentro desses parâmetros, apenas foram encontradas proteínas ortólogas em espécies de tripanossomatídeos (Tabela 2.2).

TABELA 2.2. IDENTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS ORTÓLOGAS DE NTF2-like

Descrição	Cobertura	Similaridade	Identidade	E-value	ID
hypothetical protein [Trypanosoma cruzi strain CL Brener] (NTF2-like)	100%	100%	100%	0	Tc00.1047053511367.220
hypothetical protein DQ04_02151040 [Trypanosoma grayi]	100%	64%	52%	$7.00E-156$	DQ04_02151040
hypothetical protein [Trypanosoma brucei TREU927]	99%	47%	35%	$2.00E-71$	Tb10.70.5500
hypothetical protein LPMP_210460 [Leishmania panamensis]	59%	60%	46%	$1.00E-40$	LPMP_210460
conserved hypothetical protein [Leishmania braziliensis MHOM/BR/75/M2904]	50%	60%	46%	$1.00E-40$	LBRM_21_0490
conserved hypothetical protein [Leishmania mexicana MHOM/GT/2001/U1103]	41%	62%	46%	$2.00E-38$	LMXM_21_0430
hypothetical protein, conserved [Leishmania donovani]	43%	62%	46%	$2.00E-38$	LDBPK_210490
conserved hypothetical protein [Leishmania infantum JPCM5]	43%	62%	46%	$2.00E-38$	LINJ_21_0490
conserved hypothetical protein [Leishmania major strain Friedlin]	41%	62%	46%	$3.00E-38$	LMJF_21_0430

Os valores foram obtidos da comparação de NTF2-like (usado como *query*) com proteínas encontradas exclusivamente em outros tripanossomatídeos a partir de busca por Blastp (ALTSCHUL *et al.*, 1997).

Sobrepondo dos dados e utilizando as proteínas identificadas nas imunoprecipitações de Crm1, Sub2 e Hel45 com maior confiabilidade ($emPA \geq 1,5$) foi gerado um diagrama de Venn (Figura 2.18). Entre as imunoprecipitações de Crm1 e Hel45, uma proteína PGFS (anotada como *Prostaglandin F2alpha synthase*) apresentou-se relacionada.

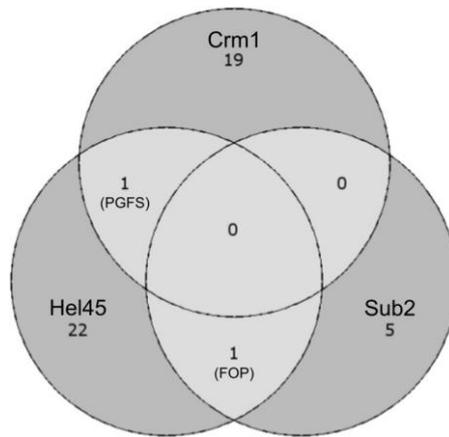


FIGURA 2.18 - DIAGRAMA DE VENN DE PROTEÍNAS IDENTIFICADAS POR IMUNOPRECIPITAÇÕES ASSOCIADAS À ESPECTROMETRIA DE MASSAS. Diagrama mostrando proteínas em comum identificadas nas imunoprecipitações de Crm1, Sub2 e Hel45 com valores de alta confiança ($emPA \geq 1,5$). Entre as IPs de Crm1 e Hel45 foi identificado uma proteína PGFS (anotada como *Prostaglandin F2 alpha synthase*); e nos complexos de Hel45 e Sub2, uma proteína anotada como hipotética nos banco de dados com domínio FOP (FOP - *Friend of PRMT1*).

Em relação aos complexos de Hel45 e Sub2 (Figura 2.18), uma proteína anotada como hipotética nos banco de dados (Tc00.1047053509033.80) com domínio FOP (FOP - *Friend of PRMT1*) na extremidade N-terminal (Figura 2.19) foi identificada. FOP, em humanos, é uma proteína associada à cromatina (van DIJK *et al.*, 2010) e faz parte do complexo TREX (CHANG *et al.*, 2013).



FIGURA 2.19 - DOMÍNIO FUNCIONAL DE PROTEÍNA CONTENDO DOMÍNIO TcFOP DE *Trypanosoma cruzi*. Domínios identificado através do programa hmmscan do pacote HMMER (EDDY, 1998): o domínio FOP (FOP - *Friend of PRMT1*) foi encontrado na extremidade C-terminal entre os aminoácidos 174 e 207, com e-valor de $7.7e-05$.

Em geral, concluímos que a análise de imunoprecipitação associada à espectrometria de massas, seguido da análise de domínios funcionais das proteínas identificadas foi uma abordagem bastante importante, como forma de alcançar novos candidatos e, assim aprofundar os estudos na caracterização dos componentes para a dissecação da via de exportação de mRNA em tripanossomatídeos.

5. DISCUSSÃO

Os tripanossomatídeos são eucariotos altamente divergentes que evolutivamente ramificaram na base da árvore filogenética (BALDAUF, 2008; PAWLOWSKI, 2014). Como consequência, desenvolveram alguns mecanismos muito peculiares quanto a sua biologia, entre estes estão incluídos fatores únicos ou com características funcionais distintas dos outros eucariotos que são responsáveis pela regulação da expressão gênica (GAZESTANI *et al.*, 2014). Este parece ser também o caso da via de exportação de mRNA, conforme demonstrado por recentes trabalhos que vem desvendando os componentes desse transporte (SERPELONI *et al.*, 2011a; SERPELONI *et al.*, 2011b; DOSTALOVA *et al.*, 2013). Um desses trabalhos utilizou a abordagem de genômica comparativa para analisar a conservação das proteínas envolvidas nas vias de exportação de diferentes tipos de RNAs ao longo da filogenia de eucariotos, incluindo aqueles que divergiram na base da árvore filogenética (SERPELONI *et al.*, 2011a). Dentre as proteínas analisadas, somente algumas se apresentaram altamente conservadas na via de exportação de mRNA, diferente do encontrado para as proteínas relacionadas às vias de transporte de outros RNAs. Neste trabalho, foi realizada uma varredura por candidatos a ortólogos em 65 espécies representativas da evolução eucariótica, usando como semente de busca proteínas de mamíferos e leveduras com a função caracterizada (Figura 9, Introdução). Parâmetros como o critério de correspondência de *reciprocal best hit* (RBH), a cobertura, similaridade, identidade e valores de *e-value* obtidos das análises com a ferramenta Blastp (ALTSCHUL *et al.*, 1997) foram utilizados para gerar uma tabela representativa de diferentes níveis de similaridade ao longo da filogenia. Assim, a partir desse estudo, que tinha o objetivo de identificar proteínas candidatas a ortólogos, foi possível avaliar o panorama do nível de conservação desses fatores envolvidos no transporte de RNA em diferentes grupos de eucariotos, incluindo parasitas. Estes dados serviram de base para a seleção de proteínas de parasitas visando então a sua caracterização funcional e buscando entender dois pontos: a exportação de mRNA estaria ocorrendo por vias mais simplificadas e, conseqüentemente, algumas das proteínas existentes em fungos, por exemplo, não existiriam em parasitas? Ou a exportação também poderia ser um processo especializado, mas decorrente da alta divergência desses parasitas, estariam atuando proteínas ainda desconhecidas e diferentes dos fatores presentes em fungos e mamíferos?

Diante deste cenário, buscamos aprofundar a identificação de fatores que apresentassem papel nas vias de transporte em tripanossomatídeos através de estudos experimentais de análise funcional daquelas proteínas mais conservadas. Entre estas, a mais conservada pelas análises de genômica comparativa (SERPELONI *et al.*, 2011a) foi a RNA helicase Sub2, cuja conservação de sequência correspondeu a similaridade de função (SERPELONI *et al.*, 2011b; Anexos). Em *T. cruzi*, vimos que a ortóloga de Sub2 (TcSub2) é localizada dentro do núcleo de epimastigotas e associada com sítios ativos de transcrição de RNAPol II e processamento. Além disso, após a diminuição da quantidade da proteína ortóloga em *T. brucei*, TbSub2, através da ferramenta de RNA de interferência (RNAi) houve o impedimento da translocação de transcritos poliadenilados para o citoplasma, seguido de morte dos parasitas, demonstrando que essa proteína tem papel nesse processo de exportação de mRNAs, provavelmente no início da via, como em fungos, e sua função é essencial para a sobrevivência desses parasitas (SERPELONI *et al.*, 2011b). Assim, a presença em parasitas de um fator específico da exportação de mRNA poderia sugerir a ideia de que estes eucariotos também apresentavam uma via especializada com componentes específicos e diferentes das vias envolvendo a exportação de outros tipos de RNA. Contudo, certamente era necessário investir na identificação e estudo da função de outros componentes.

Outra proteína candidata aos estudos funcionais foi a proteína de massa molecular de 45 kDa de *T. cruzi*, anotada como RNA helicase dependente de ATP da família DEAD/H e, assim, denominada de Hel45. No trabalho de genômica comparativa (SERPELONI *et al.*, 2011a), essa proteína mostrou-se conservada ao longo das espécies de eucariotos e era uma candidata a ortóloga de Dbp5 em *T. cruzi*. Com isso, os experimentos iniciais foram conduzidos de modo a verificar se esta conservação de sequência também corresponderia à conservação da função e os dados iniciais de sua caracterização funcional foram apresentados em formato de publicação no Capítulo 1 (INOUE *et al.*, 2014). Resumidamente, verificamos que Hel45 está presente tanto no núcleo quanto no citoplasma, com localização próxima às regiões de poro no lado citoplasmático. A migração entre estes dois compartimentos é dependente da transcrição ativa de mRNA. Logo, seriam características similares à Dbp5, visto que esta é uma proteína que migra entre o núcleo e o citoplasma (HODGE *et al.*, 1999), iniciando a interação com o mRNA durante a transcrição (ZHAO *et al.*, 2002; ESTRUCH & COLE, 2003) e sendo transportada associada ao transcrito até o lado citoplasmático do envelope nuclear

onde é ativada então por nucleoporinas e outras proteínas (DEL PRIORE *et al.*, 1997). Desta forma ocorre a dissociação do receptor Mex67 do mRNP (LUND & GUTHRIE, 2005), liberando o mRNA para a tradução. Contudo, Hel45 também apresentou alta similaridade de sequência e estrutura tridimensional (Figura 1, Capítulo1) com outras RNA helicases da família DEAD-box, principalmente membros do grupo eIF4A (Tabela 2.1). Proteínas dessa família são bastante similares e caracterizadas pela presença de nove motivos bem conservados (CORDIN *et al.*, 2006; LINDER, 2006) distribuídos entre dois domínios funcionais (amino e carboxi-terminal). Estes domínios estão bem conservados em Hel45, indicando que ela se trata de uma proteína tipo DEAD-box (Figura 1, Capítulo1) e isso explicaria sua alta similaridade com outros membros. No entanto, sequências das extremidades amino e carboxi-terminal normalmente não são conservadas e isto diferencia a função biológica entre essas proteínas, definindo a localização subcelular, especificidade de substrato e interação proteína-proteína, por exemplo (CORDIN *et al.*, 2006). Assim, comparando a sequência com Dbp5, Hel45 não apresentou uma sequência de seis aminoácidos não consenso inseridos no domínio C-terminal entre motivos V e VI, presente na maioria dos ortólogos caracterizados (SNAY-HODGE *et al.*, 1998; ZHAO *et al.*, 2002; ROLLENHAGEN *et al.*, 2004). Em fungos, essa sequência é representada pelos aminoácidos NGQADP e está envolvida na exportação de mRNA em situação de estresse (ROLLENHAGEN *et al.*, 2004). Além disso, outra diferença foi a ausência de uma região N-terminal em Hel45 que, em humanos, está associada à regulação intrínseca da atividade ATPase de Dbp5 (COLLINS *et al.*, 2009), pois a partir da hidrólise de ATP, Dbp5 consegue remodelar os mRNPs em associação com proteínas do poro nuclear no citoplasma. Sendo assim, as diferenças de sequência com ortólogos de Dbp5 sugeriam que Hel45 poderia não ter a mesma função. Essa ideia foi reforçada por outros resultados. Por exemplo, Hel45 não esteve associada ao final da tradução (Figura 2, Capítulo1) como Dbp5 (GROSS *et al.*, 2007) e também apresentava alta similaridade com proteínas da família eIF4A, principalmente eIF4AIII (Figura 1, Capítulo1). Apesar dessas diferenças, neste mesmo trabalho (INOUE *et al.*, 2014), foi demonstrado que o transporte de Hel45 para o citoplasma dependia da via de exportação de mRNA pelo ortólogo do receptor Mex67 em *T. brucei* (DOSTALOVA *et al.*, 2013). Por conseguinte, o envolvimento de Hel45 na via de exportação de mRNA em tripanossomatídeos não podia ser descartado. Para tentar decifrar a questão da ortologia de Hel45, foi realizada sua análise filogenética (Figura 2.2, Capítulo 2)

buscando o direcionamento das hipóteses a serem testadas para entender a função da proteína. Com esta análise, foi constatado que Hel45 é na verdade ortóloga de eIF4AIII de humanos, uma proteína que também migra entre núcleo e citoplasma e componente do complexo EJC. Este ponto é bastante intrigante, pois praticamente não existem dados funcionais sobre o complexo EJC em tripanossomatídeos. A análise dos componentes do EJC de tripanossomatídeos realizada por Bercovich *et al.* (2009) demonstrou a identificação somente de Mago e Y14 no complexo e nenhuma proteína ortóloga de eIF4AIII foi apresentada. Além disso, o complexo EJC de humanos associa-se ao mRNA em regiões de junção de exons após processamento por *cis-splicing*. Contudo, em tripanossomatídeos este evento é praticamente inexistente, pois a grande maioria dos genes codificadores de proteínas não contém introns e é transcrita em RNAs policistrônicos que são processados por *trans-splicing* (AGABIAN, 1990; PREUßER, 2012). Sendo assim, apesar da identificação de alguns componentes de EJC em tripanossomatídeos, ainda não se sabe a função destes fatores no metabolismo de mRNA tampouco a associação com *trans-splicing*. Nesta etapa do trabalho, foi necessário então investir na análise funcional de Hel45 utilizando abordagens de genética reversa cujos dados, ainda não publicados, foram apresentados no Capítulo 2 após os resultados de filogenia.

Dentro dos objetivos visando à caracterização funcional, foi obtida uma linhagem nocaute de Hel45 em *T. cruzi*, mostrando que a ausência da proteína não foi letal ao parasita (Figura 2.5, Capítulo 2) e não causou acúmulo de mRNA no núcleo (Figura 2.10, Capítulo 2). Este resultado foi semelhante às análises feitas com *T. brucei* com o silenciamento de TbHel46 por RNAi (Figuras 2.8 e 2.9, Capítulo 2). Portanto, estes fenótipos reforçam a ideia que Hel45 não seria a proteína ortóloga de Dbp5 em tripanossomatídeos, principalmente porque mutantes de Dbp5 em leveduras apresentaram morte celular e acúmulo nuclear de mRNA (TSENG *et al.*, 1998; SNAY-HODGE *et al.*, 1998). Estes dados também indicam que Hel45 não é essencial para a exportação geral de mRNA, pois não observamos nos parasitas nocautes uma alteração fenotípica notável nem mudança evidente de localização de mRNA total no núcleo, como demonstrado no silenciamento de Sub2 (SERPELONI *et al.*, 2011b) e de Mex67 (DOSTALOVA *et al.*, 2013) de *T. brucei*. Porém, a ausência de acúmulo não indicaria que necessariamente Hel45 não poderia apresentar função na exportação de mRNA, pois em *Drosophila* foi demonstrado que o silenciamento de proteínas como Aly ou componentes de EJC não resultou

em inibição do transporte (GATFIELD & IZAURREALDE, 2002). Além disso, outros fatos apoiavam a investigação do papel de Hel45 na via de exportação de mRNA ou no metabolismo de mRNA como:

a) Hel45 é ortóloga de eIF4AIII, um componente de EJC que também participa da exportação de mRNA em mamíferos;

b) o silenciamento de Mex67, um componente específico da exportação de mRNA, afeta a migração de Hel45;

c) sua migração para o citoplasma depende de transcrição ativa de RNAs.

Ademais, apesar do nocaute não ser letal, observamos que afetou drasticamente o crescimento e a diferenciação do *T. cruzi*, sugerindo uma função importante de Hel45 para o desenvolvimento do parasita. Considerando essas informações, outras análises foram realizadas para continuar os estudos quanto aos efeitos gerados pela ausência de Hel45. Devido sua similaridade com o fator de iniciação da tradução eIF4A, foi verificado se o nocaute de Hel45 poderia afetar a síntese de proteínas; os resultados obtidos mostraram que o nocaute causa a diminuição na quantidade de polissomos (Figura 2.10B), assim como o nível de tradução (Figura 2.10C). No entanto, esta alteração não modulou a expressão global de proteínas, pois somente algumas proteínas entre parasitas KO e WT apresentaram alteração na abundância (Figura 2.11), das quais sete estavam aumentadas e sete diminuídas nos parasitas nocautes, com base em critérios estridentes de estatística.

As análises de sedimentação de polissomos em gradiente de sacarose (Figura 2, Capítulo 1) demonstraram que Hel45 não está presente em frações correspondentes a polirribossomos e o nocaute do gene afetou a tradução de poucas proteínas, sugerindo que Hel45 poderia desempenhar um papel entre o final do transporte de mRNA e o início da tradução. Assim, primeiramente foi verificado se o nocaute também tinha afetado a abundância dos mRNAs correspondentes às proteínas com expressão modulada. Os dados obtidos sugerem que a abundância das amostras de mRNAs foi menos discrepante, com diferenças mais sutis, que as de proteína. Somente para *U2 splicing auxiliary factor 1* foi observado aumento na quantidade de mRNA no parasita nocaute. Com os dados obtidos, não foi possível correlacionar o nível de mRNA aos de proteína nem realizar maiores inferências em relação ao resultado, uma vez que os mRNAs analisados foram escolhidos aleatoriamente nessa análise, não permitindo uma visão panorâmica do transcriptoma. Apesar disso, ficaram algumas dúvidas sobre o que poderia estar

afetando a tradução nos parasitas nocautes. Hel45 teria uma função direta na tradução? Os mRNAs cuja expressão proteica foi alterada estariam acumulados dentro do núcleo e por isso não estariam sendo traduzidos? Ou a diminuição e o aumento do nível de algumas proteínas seria devido à repressão ou ao favorecimento da tradução destes mRNAs pela maquinaria? Logo, ainda é necessário investir em abordagens experimentais que tentem responder estas questões.

Algumas hipóteses podem ser levantadas. Observando os dados de proteômica, a proteína ribossomal L37 foi a que apresentou a maior diferença na abundância nos parasitas nocautes (Figura 2.11), estando diminuída nestes parasitas. Isso pode sugerir que a diminuição na quantidade de polissomos seria um efeito indireto, consequente da expressão alterada de componentes na maquinaria de tradução. Além disso, existem evidências que demonstraram que EJC atua de modo geral na potencialização da tradução, favorecendo que mRNA processados por *cis-splicing* sejam mais eficientemente incorporados aos polissomos do que aqueles que não passaram por esse processamento (NOTT *et al.*, 2004). Em mamíferos, eIF4AIII também pode auxiliar a iniciação da tradução dependente de *cap*, sendo recrutado para desfazer estruturas secundárias da região 5' UTR do mRNA (CHOE *et al.*, 2014).

Pelos dados obtidos até o momento, não podemos afirmar que Hel45 seria componente de uma via de controle geral, visto que não foi observada nenhuma alteração global nos parasitas nocautes na exportação de mRNA do núcleo, na abundância de mRNA ou na expressão de proteínas, mesmo que tenha diminuído a taxa de tradução geral, que pode ser um efeito indireto, como exposto acima. Assim, poderíamos especular que Hel45 poderia estar relacionada a vias alternativas de transporte e/ou remodelamento, que definiriam o destino de alguns tipos mRNAs no citoplasma, ou até mesmo como potencializador da tradução, podendo ser dispensável, semelhante ao que vem sendo descrito para EJC (GATFIELD & IZAURRALDE, 2002; NOTT *et al.*, 2004). Estudos recentes mostram a existência de vias alternativas de exportação de mRNA, como é o caso de ALREX (ALREX – *alternative mRNA nuclear export*). Essas vias são ativadas por mRNAs específicos que contêm um elemento como SSCR (*signal sequence coding region*) ou MSCR (*mitochondrial-targeting sequence coding region*) na extremidade 5' da fase aberta de leitura (PALAZZO *et al.*, 2007; CENIK *et al.*, 2011), responsáveis pela codificação da maioria das proteínas secretadas de membrana ou de mitocôndria de

vertebrados. Ainda faltam dados de como os mRNPs iniciam sua formação nessas sequências, mas acredita-se que os fatores trans que se ligam a esses elementos atuam recrutando outras proteínas, como o exportador Mex67-Mtr2 (PALAZZO *et al.*, 2007; CENIK *et al.*, 2011). Além disso, foi demonstrado que o elemento SSCRs também pode aumentar a atividade da tradução desses mRNAs, provavelmente por um rearranjo de mRNP na face citoplasmática do poro nuclear após a exportação (MAHADEVAN *et al.*, 2013).

De qualquer modo, outras análises serão necessárias para avaliar quais eventos relacionados ao metabolismo do mRNA foram afetados nos parasitas nocautes, como verificar se existe acúmulo de mRNAs específicos no núcleo ou se existem diferenças na abundância destes mRNAs nas frações de polirribossomos. Além disso, avaliar se os mRNAs das proteínas cuja expressão é alterada no nocaute seriam “alvos” de Hel45, também ajudaria a dissecar os eventos moleculares de Hel45.

Para a melhor compreensão do contexto molecular em que as proteínas estão inseridas, outra abordagem utilizada neste estudo foi a imunoprecipitação de complexos de proteínas seguida da identificação destas por espectrometria de massas. Para tanto, utilizamos duas inovações em nosso protocolo nesse tipo de ensaio em *T. cruzi*. O primeiro foi a utilização de *cryogrinding* a partir da moagem das células em nitrogênio líquido para o preparo das amostras, com vantagens para preservação de complexos, que seria útil no caso sistemas com interações dinâmicas, por ser também bastante eficaz pela rapidez, eliminação de detergentes caotrópicos e redução de problemas com proteases, fosfatases e outros fatores que podem degradar a amostra (FIELD *et al.*, 2012). Outra inovação foi a utilização de *nanobody*, que são peptídeos recombinantes expressados em bactérias correspondentes a domínios tipo VHH de ligação a antígenos de anticorpos não convencionais provenientes da imunização em camelídeos (MUYLDERMANS, 2013). Assim, utilizamos parasitas expressando Hel45 fusionada a GFP na extremidade N-terminal para fazer os ensaios de imunoprecipitação com o *nanobody* anti-GFP. Constatamos que o protocolo utilizado ajudou a conferir alta afinidade do anticorpo à proteína fusionada, aumentando assim a eficiência dos ensaios de imunoprecipitação (Figuras 2.13, 2.15 e 2.16).

Por ser órtologa de eIF4AIII, Hel45 pode ter a mesma função desta proteína e ser mais um componente de EJC, pois associa-se com os heterodímeros estáveis (BERCOVICH *et al.*, 2009) Mago (com alto valor de confiança) e Y14 (com menor

valor estatístico) (Figura 2.16, Capítulo 2), complementando os dados do trabalho anterior de identificação dos componentes de EJC. Assim, essa foi a primeira evidência da presença de um ortólogo de eIF4AIII nesses complexos em tripanossomatídeos. Caso faça parte de EJC, Hel45 poderia associar-se ao mRNA durante o *trans-splicing*, visto que, no núcleo, Hel45 está localizada em regiões de borda de cromatina eletrodensa, que são sítios característicos de processamento (Figura 3, Capítulo 1). Além disso, Hel45 migra entre núcleo e citoplasma dependente tanto da transcrição quanto da via de exportação de mRNA por Mex67 (Figura 6, Capítulo 1). Como eIF4AIII também migra para o citoplasma associado ao mRNA, é possível que ambos desempenhem uma função similar no citoplasma, que poderia estar relacionada a NMD (NMD - *Non-sense mediated decay*), afinal eIF4AIII é uma proteína essencial para que este processo ocorra (GEHRING *et al.*, 2003; FERRAIUOLO *et al.*, 2004; SHIBUYA *et al.*, 2004; PALACIOS *et al.*, 2004). Neste caso, quando associado a mRNAs processados corretamente, EJC é removido pela proteína PYM durante o primeiro ciclo de alongação do ribossomo (GEHRING *et al.*, 2009). Todavia, quando associado a mRNAs com códons prematuros de terminação (PTC), EJC serve como ativador do sistema de controle de qualidade por NMD durante a tradução (GEHRING *et al.*, 2003; SHIBUYA *et al.*, 2004). Os mRNAs corretamente processados não apresentam introns e desta forma não apresentam EJC depositado na região 3' UTR. Devido a isso, a maquinaria de NMD distingue o codon de terminação canônico do não-canônico. Caso EJC permaneça associado à última junção exon-exon processada, ocorre a fosforilação da helicase Upf1 ligada ao ribossomo no PTC. Essa fosforilação ocorre pela kinase Smg1, iniciando o recrutamento de fatores que vão degradar o mRNA (BROGNA & WEN, 2009) (Figura 5.1). Porém, em tripanossomatídeos, somente as proteínas Upf1 e Upf2 apresentaram ortólogos e existem algumas suspeitas sobre o funcionamento desse sistema (DELHI *et al.*, 2011). Essas proteínas não foram identificadas nos complexos de Hel45, mas isso pode ser decorrente da dinâmica das interações transientes dessas proteínas Upfs, principalmente Upf3, que interage com Y14 do EJC (GEHRING *et al.* 2003) no desencadeamento de NMD.

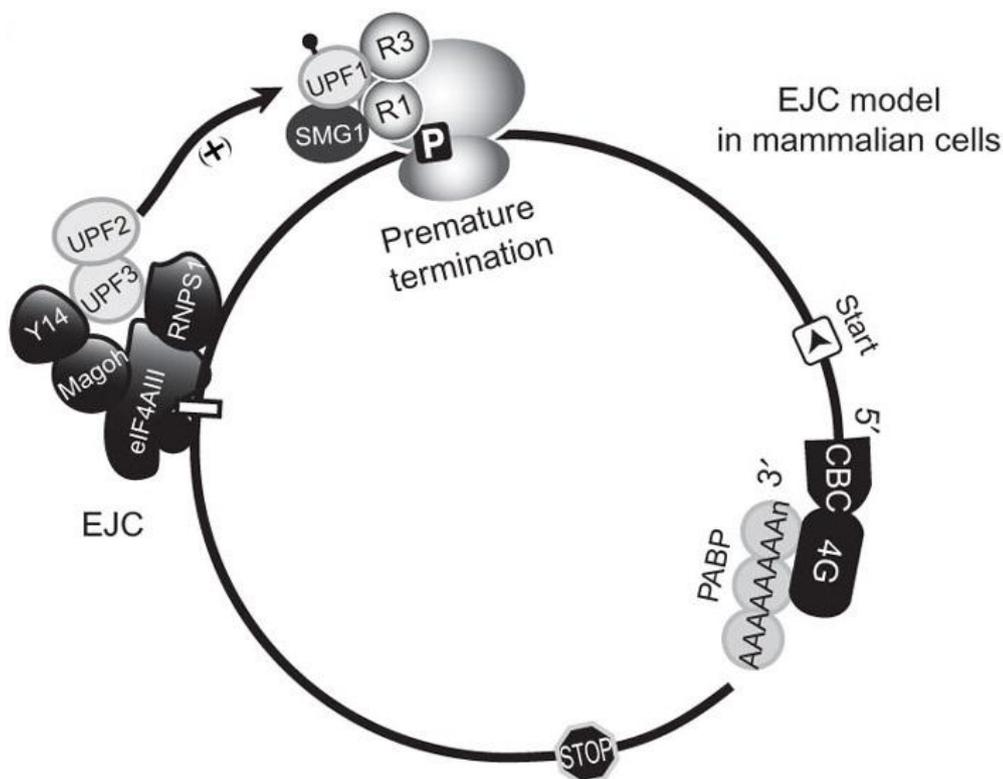


FIGURA 5.1 – MECANISMO DE ATIVAÇÃO DE NMD EM MAMÍFEROS. A terminação da tradução em um códon precoce recruta os fatores responsáveis pelo NMD. EJC (representado por eIF4AIII, Magoh, Y14 e RNPS1), localizado numa posição de 50-55 nucleotídeos da última junção exon-exon, recruta os fatores UPF2 e UPF3 que favorecem, a partir da quinase SMG1, a fosforilação da helicase UPF1. Essa etapa inicia o recrutamento da maquinaria de degradação do mRNA. PABP, proteína de ligação a poli A; CBC, complexo de ligação ao *cap*; e 4G, complexo de iniciação da tradução, estão representados na figura, demonstrando a montagem do complexo de iniciação da tradução. FONTE: Adaptado de BROGNA & WEN, 2009.

Outra proteína não identificada nos complexos de Hel45 foi o receptor Mex67 (Figura 2.16, Capítulo2). Esse não era um resultado esperado, visto que a migração de Hel45 está relacionada à via de exportação de mRNA por esse receptor (Figura 6, Capítulo 1). Vale destacar que, além de Mex67, nenhum receptor já caracterizado (por exemplo, Crm1) foi identificado em associação à Hel45, o que também pode ser em virtude das interações transitórias entre Hel45 e esses fatores de transporte. Porém, acreditamos que Hel45 possa migrar para o citoplasma também por outras vias, além daquela envolvendo Mex67. O sinal de exportação nuclear geralmente consiste de uma região hidrofóbica, rica principalmente em leucina (LA COUR *et al.*, 2003) para a interação com exportinas dependentes de gradiente de GTP fornecida por Ran. Neste trabalho, mostramos um sinal NES de Hel45 que é funcional (Figura 4, Capítulo 1), todavia, não conseguimos destacar qual exportina poderia estar relacionada ao transporte de Hel45. Possivelmente, essa exportina não seja Crm1, já que o tratamento com leptomicina B (Figura 6,

Capítulo 1) não impediu o transporte de Hel45 e também porque nas imunoprecipitações não foi identificada a interação entre ambos (Figuras 2.15 e 2.16), logo o NES identificado em Hel45 parece não ser reconhecido por Crm1. De qualquer forma, Hel45 também pode estar relacionada a uma via ainda não caracterizada, com o envolvimento de um receptor com domínio NTF2 (NTF2-like), já que esta proteína, exclusiva de tripanossomatídeos, foi identificada nas análises de proteômica como um possível fator que interage com Hel45. Este domínio NTF2-like também está presente em receptores de transporte como Mex67 de fungos e de humanos (FRIBOURG *et al.*, 2001; DOSTALOVA *et al.*, 2013). Além disso, esse fator NTF2-like foi identificado também nas análises do trabalho de identificação dos componentes de EJC de tripanossomatídeos (BERCOVICH *et al.*, 2009), interagindo com Y14, mas nenhuma análise funcional foi demonstrada para essa proteína. Porém, o fato de que o transporte de Hel45 foi interrompido no silenciamento de Mex67 (Figura 6, Capítulo 1) foi bastante interessante, demonstrando que de alguma forma existe associação entre proteínas que interagem com Hel45 e com fatores da via mediada por esse receptor.

Embora aparentemente não interaja com Mex67, Hel45 poderia estar relacionada a uma função de EJC na via de exportação de mRNA como os ortólogos em mamíferos: o recrutamento de Sub2 (KATAOKA *et al.* 2000; LUO *et al.* 2001) para o mRNA, que, conseqüentemente, estaria favorecendo a ligação de Mex67. Essa hipótese é sustentada pela análise dos complexos de TcSub2 e de Hel45 (Figuras 2.13 e 2.16, Capítulo 2, respectivamente). Apesar do baixo valor estatístico ($emPAI < 1,5$), TcSub2 foi identificado nos complexos de Hel45 e o inverso também foi observado. Essa co-imunoprecipitação entre as duas proteínas é um forte indicativo que elas interagem. Além disso, análises de microscopia eletrônica (Figura 3, Capítulo 1) de Hel45 mostraram bastante similaridade no padrão de localização nuclear com TcSub2 (SERPELONI *et al.*, 2011b) em regiões de borda cromatina, sugerindo que essa associação possa realmente acontecer. Outro ponto bastante importante foi a identificação com alta confiança ($emPAI > 1,5$) de uma proteína hipotética denominada de FOP tanto na imunoprecipitação de Hel45 quanto na de TcSub2. Esse resultado demonstra a existência do complexo composto por Hel45, TcSub2 e FOP. Também chamada de Chtop (*Chromatin target of PRMT1 protein*), em mamíferos, FOP foi apresentada como um componente de TREX e é essencial para a exportação de mRNA, pois atua na ativação e ligação a Sub2 e se liga ao domínio NTF2-like de Mex67 (CHANG *et al.*, 2013). Em outras células, o

recrutamento dos fatores como Sub2 (STRÄSSER & HURT, 2001) e, principalmente, Mex67 (SEGREF *et al.*, 1997) é essencial para o funcionamento da via.

Além dessas proteínas, outra bastante promissora foi API5, que interagiu com Sub2-GFP. Esta proteína apresentou semelhança com a importina transportina 2, também denominada de *karyopherin beta 2b* (SHAMSHER *et al.*, 2002), que em metazoários está relacionada com o processo de importação para o núcleo dos componentes relacionados a via de exportação. Como em tripanossomatídeos os componentes de TREX não estão conservados (SERPELONI *et al.*, 2011a; ERBEN *et al.*, 2014) e pouco foi descrito em relação à EJC. As proteínas identificadas podem servir de base para o desenvolvimento de estudos que ajudarão a desvendar os mecanismos, principalmente no início da via no recrutamento da proteína Sub2. Por fim, os resultados de proteômica também mostraram que Hel45 interage com proteínas envolvidas em diferentes vias do metabolismo de RNA sugerindo um quadro mais complexo, no qual ela poderia estar relacionada a diversas funções moleculares. Isso não seria surpresa uma vez que ortólogos de eIF4AIII também estão relacionados a diversas funções e atuando em diferentes vias moleculares (Figura 8, Capítulo 1). Contudo, para confirmar a presença de todos os fatores identificados por proteômica, dados de validação de interação proteína-proteína serão importantes na figuração de uma rede funcional, em que Hel45 de *T. cruzi* apresenta atividade biológica, com base nas evidências que vêm sendo obtidas. Em relação à via de exportação de mRNA, observamos que Hel45 está aparentemente associada ao ortólogo de FOP, possível proteína do complexo TREX, e ao EJC, como também interagiu diretamente com Sub2. Assim, Hel45 poderia estar relacionada ao recrutamento de Sub2 a partir dessas interações. Desse modo, esses dados sugerem que *T. cruzi* possa ter vias alternativas de iniciação dos complexos de exportação de mRNA, uma vez que o nocaute de Hel45 não resultou em acúmulo de mRNA no núcleo e a manutenção do transporte poderia ser equilibrada por diferente(s) via(s).

A representação abaixo (Figura 5.2) ilustra as principais hipóteses expostas diante dos resultados obtidos. Até o momento, podemos inferir que Hel45, ortólogo de eIF4AIII de humano, localizado no núcleo e citoplasma, pode migrar entre ambos compartimentos. Porém sua entrada no núcleo ocorre por mecanismos ainda desconhecidos. Além disso, Hel45 pode interagir com proteínas de EJC (Mago e, possivelmente, Y14), um receptor NTF2-like e formar complexo com Sub2 e FOP. Este último complexo, corrobora com o papel potencial de Hel45 na via de

exportação de mRNA no recrutamento do receptor Mex67 que pode estar mediando a passagem do mRNP pelo complexo do poro nuclear (CPN) a partir da interação com nucleoporinas.

A função de Hel45 no citoplasma, ainda é incerta. Algumas vias definindo o destino do mRNA nesse compartimento foram especuladas e estão representadas na Figura 5.2:

- Hel45 poderia atuar no remodelamento de mRNPs;
- Participar de NMD;
- Estar associada ao início da tradução;
- Atuar na regulação de expressão gênica não como componente de grânulos de DHH1 e XRNA;
- Ou Hel45 pode estar relacionada a alguma outra maquinaria, uma vez que EJC pode participar de diversos processos do metabolismo de mRNA.

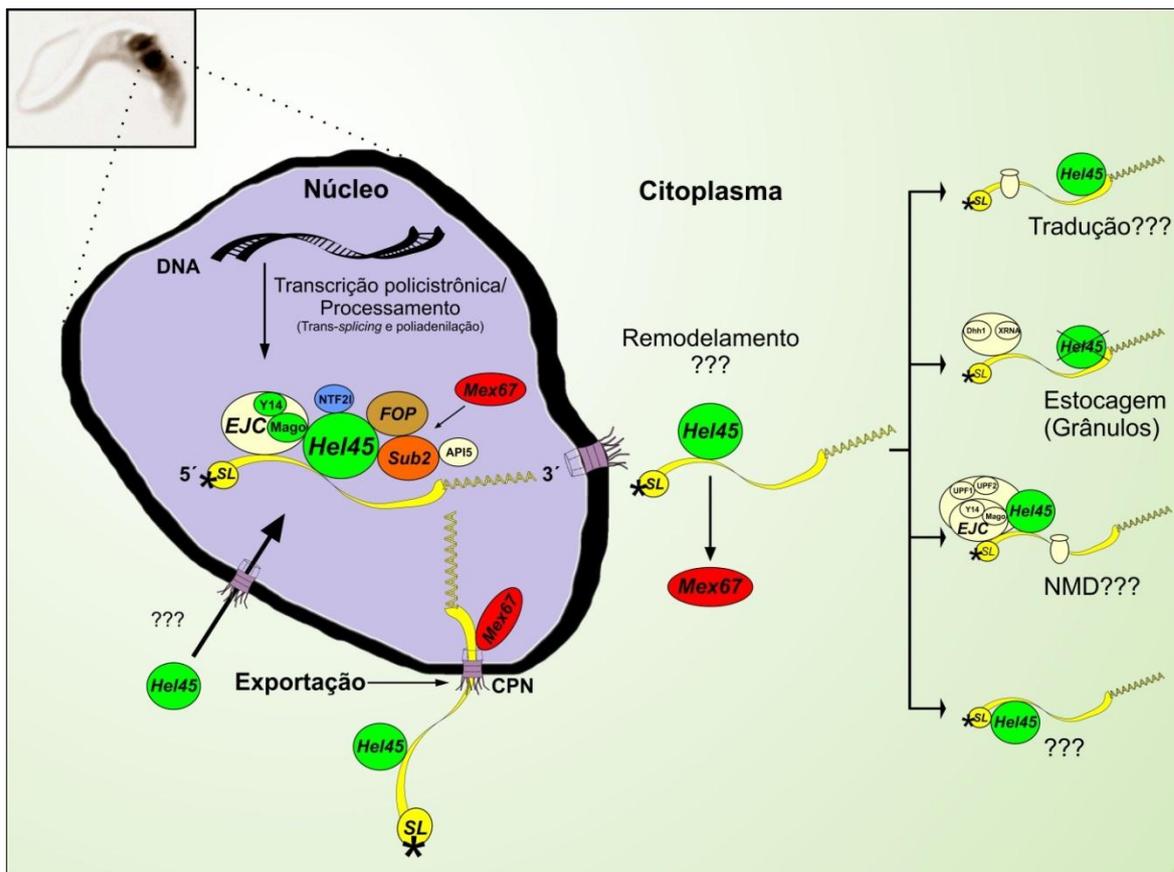


FIGURA 5.2 – MODELO ESQUEMÁTICO DE POSSÍVEIS FUNÇÕES DE Hel45 em *Trypanosoma cruzi*. Hel45 pode se associar ao mRNA durante o processamento, compondo o complexo EJC juntamente com Mago e Y14. A associação de Hel45 com Sub2 e FOP pode sugerir que este complexo inicie a formação do mRNP para a exportação, com o recrutamento do receptor Mex67. Assim, Hel45 pode migrar entre o núcleo e o citoplasma dependente de uma via de exportação de mRNA pelo receptor Mex67. No citoplasma, Hel45 pode atuar no remodelando complexos mRNPs definindo o destino de mRNA, como tradução, estocagem, ou degradação pelo NMD.

Levando em consideração os resultados desse trabalho podemos afirmar que Hel45 tem papel no metabolismo de RNA e, provavelmente, está relacionada a uma via de exportação de mRNAs, o que a torna um interessante objeto de estudo em tripanossomatídeos. Acreditamos que para desvendar o contexto molecular de Hel45, os estudos funcionais devem ser direcionados para duas vertentes: Primeiramente, a análise dos mRNAs associados a Hel45 poderá indicar se existe preferência de interação por RNAs funcionalmente relacionados bem como a identificação de fatores cis-regulatórios dos alvos e possível ligação a sequências nucleotídicas específicas. O segundo ponto está relacionado às proteínas que interagem com Hel45 através da validação das interações identificadas para a compreensão do contexto molecular em que esta proteína está inserida. Assim, o panorama molecular das funções de Hel45 pode ajudar na elucidação dos mecanismos das vias de controle de regulação pós-transcricional em tripanossomatídeos, que estão diretamente relacionadas a uma rápida e precisa resposta na expressão gênica, necessária para a adaptação e sobrevivência do parasita devido às variações do ambiente,.

6. REFERÊNCIAS

- ABRUZZI, K. C.; LACADIE, S.; ROSBASH, M. Biochemical analysis of TREX complex recruitment to intronless and intron-containing yeast genes. **EMBO J**, v. 23, n. 13, p. 2620-2631, 7 jul. 2004.
- AGABIAN, N. Trans Splicing of Nuclear Pre-mRNAs. **Cell**, v. 61, n. 7, p. 1157-1160, 1990.
- ALBERTS, B. et al. **Molecular Biology of the Cell**. 4th ed ed. New York: Garland Science, 2002.
- ALTSCHUL, S. F. et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST : a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Res**, v. 25, n. 17, p. 3389-3402, 1997.
- ALVES, L. R. et al. Proteomic analysis reveals the dynamic association of proteins with translated mRNAs in *Trypanosoma cruzi*. **Gene**, v. 452, n. 2, p. 72-78, 2010.
- ALVES, L. R. et al. The mRNAs associated to a zinc finger protein from *Trypanosoma cruzi* shift during stress conditions. **RNA biol**, v. 11, n. 7, p. 921-933, jan. 2014.
- ANDREOU, A. Z.; KLOSTERMEIER, D. The DEAD-box helicase eIF4A Paradigm or the odd one out ? **RNA Biol**, v. 10, n. 1, p. 19-32, 2013.
- ARAÚJO, P. R.; TEIXEIRA, S. M. Regulatory elements involved in the post-transcriptional control of stage-specific gene expression in *Trypanosoma cruzi* - A Review. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 106, n. 3, p. 257-266, 2011.
- ARCHER, S. K. et al. *Trypanosoma brucei* PUF9 regulates mRNAs for proteins involved in replicative processes over the cell cycle. **PLoS Pathog**, v. 5, n. 8, p. e1000565, ago. 2009.
- ASLETT, M. et al. TriTrypDB: a functional genomic resource for the Trypanosomatidae. **Nucleic Acids Res**, v. 38, n. Database issue, p. D457-D462, jan. 2010.

- BAGLEY, S. et al. The nuclear pore complex. **J Cell Sci**, v. 113, n. Pt 22, p. 3885-3887, 2000.
- BALDAUF, S. L. An overview of the phylogeny and diversity of eukaryotes. **Journal of Systematics and Evolution**, v. 46, n. 3, p. 263-273, 2008.
- BARKER, K. S. et al. Genome-wide expression profiling reveals genes associated with amphotericin B and fluconazole resistance in experimentally induced antifungal resistant isolates of *Candida albicans*. **J Antimicrob Chemother**, v. 54, n. 2, p. 376-385, ago. 2004.
- BARTHOLOMEU, D. C. et al. Trypanosoma cruzi: RNA structure and post-transcriptional control of tubulin gene expression. **Exp Parasitol**, v. 102, n. 3-4, p. 123-133, nov. 2002.
- BARTHOLOMEU, D. C. et al. Unveiling the Intracellular Survival Gene Kit of Trypanosomatid Parasites. **PLoS Pathog**, v. 10, n. 12, p. e1004399, dez. 2014.
- BATISTA, J. A. N. et al. Characterization of a Trypanosoma cruzi poly(A)-binding protein and its genes. **Mol Biochem Parasitol**, v. 67, n. 2, p. 301-312, 1994.
- BATISTA, M. et al. A high-throughput cloning system for reverse genetics in Trypanosoma cruzi. **BMC Microbiol**, v. 10, n. 1, p. 259, jan. 2010.
- BENJAMINI, Y.; HOCHBERG, Y. Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. **J Roy Statist Soc Ser B**, v. 57, n. 1, p. 289-300, 1995.
- BERCOVICH, N. et al. Identification of core components of the exon junction complex in trypanosomes. **Mol Biochem Parasitol**, v. 166, n. 2, p. 190-193, ago. 2009.
- BROGNA, S.; WEN, J. Nonsense-mediated mRNA decay (NMD) mechanisms. **Nat Struct Mol Biol**, v. 16, n. 2, p. 107-113, fev. 2009.

- BRUN, R.; SCHÖNENBERGER, M. Cultivation and in vitro cloning or procyclic culture forms of *Trypanosoma brucei* in a semi-defined medium. Short communication. **Acta Trop**, v. 36, n. 3, p. 289-292, 1979.
- BUSTIN, S. A et al. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. **Clin Chem.**, v. 55, n. 4, p. 611-22, abr. 2009.
- CARO, F. et al. *Trypanosoma cruzi*: analysis of the complete PUF RNA-binding protein family. **Exp Parasitol**, v. 113, n. 2, p. 112-124, jun. 2006.
- CASSOLA, A.; FRASCH, A. C. An RNA recognition motif mediates the nucleocytoplasmic transport of a trypanosome RNA-binding protein. **J Biol Chem**, v. 284, n. 50, p. 35015-35028, 11 dez. 2009.
- CENIK, C. et al. Genome analysis reveals interplay between 5'UTR introns and nuclear mRNA export for secretory and mitochondrial genes. **PLoS Genet**, v. 7, n. 4, p. e1001366, abr. 2011.
- CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Parasites - American Trypanosomiasis (also known as Chagas Disease). Disponível em: <<http://www.cdc.gov/parasites/chagas/>>. Acesso em: 01 jan. 2015.
- CHAGAS, C. Nova tripanozomiose humana - Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade morbida do homem. **Mem Inst Oswaldo Cruz Inst**, v. 1, n. 2, 1909.
- CHANG, C.-T. et al. Chtop is a component of the dynamic TREX mRNA export complex. **EMBO J**, v. 32, n. 3, p. 473-486, 6 fev. 2013.
- CHATELAIN, E. Chagas Disease Drug Discovery: Toward a New Era. **J Biomol Screen**, v. 20, n. 1, p. 22-35, jan. 2015.
- CHENG, H. et al. Human mRNA export machinery recruited to the 5' end of mRNA. **Cell**, v. 127, n. 7, p. 1389-1400, 29 dez. 2006.

- CHI, B. et al. Aly and THO are required for assembly of the human TREX complex and association of TREX components with the spliced mRNA. **Nucleic Acids Res**, v. 41, n. 2, p. 1294-1306, jan. 2013.
- CHOE, J. et al. eIF4AIII enhances translation of nuclear cap-binding complex-bound mRNAs by promoting disruption of secondary structures in 5'UTR. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 111, n. 43, p. E4577-86, 28 out. 2014.
- CLAYTON, J. Chagas disease 101. **Nature**, v. 465, n. 7301, p. S4-S5, 2010.
- COLLINS, R. et al. The DEXD/H-box RNA helicase DDX19 is regulated by an {alpha}-helical switch. **J Biol Chem**, v. 284, n. 16, p. 10296-10300, 17 abr. 2009.
- CONTRERAS, V. T. et al. In vitro differentiation of Trypanosoma cruzi under chemically defined conditions. **Mol Biochem Parasitol**, v. 16, n. 3, p. 315-327, 1985.
- CONTRERAS, V. T. et al. Biological aspects of the Dm 28c clone of Trypanosoma cruzi after metacyclogenesis in chemically defined media. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 83, n. 1, p. 123-133, 1988.
- COOK, A. et al. Structural biology of nucleocytoplasmic transport. **Annu Rev Biochem**, v. 76, p. 647-671, jan. 2007.
- CORDIN, O. et al. The DEAD-box protein family of RNA helicases. **Gene**, v. 367, p. 17-37, 15 fev. 2006.
- COUGHLIN, B. C. et al. Amastin mRNA Abundance in Trypanosoma cruzi Is Controlled by a 3'-Untranslated Region Position-dependent cis-Element and an Untranslated Region-binding Protein. **J Biol Chem**, v. 275, n. 16, p. 12051-12060, 2000.
- COURA, J. R.; BORGES-PEREIRA, J. Review Article / Artigo de Revisão Chagas disease . What is known and what should be improved : a systemic review Doença de Chagas. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 45, n. 3, p. 286-296, 2012.

- COX, J.; MANN, M. MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized p.p.b.-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification. **Nat Biotechnol**, v. 26, n. 12, p. 1367-1372, dez. 2008.
- CROSS, G.; MANNING, J. Studies on ascaridoid nematodes of pythons: two new species from New Guinea. **Parasitology**, v. 67, n. 3, p. 315-331, 6 abr. 1973.
- CUEVAS, I. C.; FRASCH, A. C. C.; D'ORSO, I. Insights into a CRM1-mediated RNA-nuclear export pathway in *Trypanosoma cruzi*. **Mol Biochem Parasitol**, v. 139, n. 1, p. 15-24, 2005.
- D'ORSO, I.; FRASCH, A. C. C. TcUBP-1, an mRNA destabilizing factor from trypanosomes, homodimerizes and interacts with novel AU-rich element- and Poly(A)-binding proteins forming a ribonucleoprotein complex. **J Biol Chem**, v. 277, n. 52, p. 50520-50528, 27 dez. 2002.
- DA SILVA, R. A; BARTHOLOMEU, D. C.; TEIXEIRA, S. M. R. Control mechanisms of tubulin gene expression in *Trypanosoma cruzi*. **Int J Parasitol**, v. 36, n. 1, p. 87-96, jan. 2006.
- DALLAGIOVANNA, B. et al. *Trypanosoma cruzi*: molecular characterization of TcPUF6, a Pumilio protein. **Exp Parasitol**, v. 109, n. 4, p. 260-264, abr. 2005.
- DALLAGIOVANNA, B. et al. Functional genomic characterization of mRNAs associated with TcPUF6, a pumilio-like protein from *Trypanosoma cruzi*. **J Biol Chem**, v. 283, n. 13, p. 8266-8273, 28 mar. 2008.
- DAROCHA, W. D. et al. Tests of cytoplasmic RNA interference (RNAi) and construction of a tetracycline-inducible T7 promoter system in *Trypanosoma cruzi*. **Mol Biochem Parasitol**, v. 133, n. 2, p. 175-186, fev. 2004.
- DE GAUDENZI, J. G.; D'ORSO, I.; FRASCH, A. C. C. RNA recognition motif-type RNA-binding proteins in *Trypanosoma cruzi* form a family involved in the interaction with specific transcripts in vivo. **J Biol Chem**, v. 278, n. 21, p. 18884-18894, 23 maio 2003.

- DE SOUZA, F. S. P. et al. Knockout of the gene encoding the kinetoplast-associated protein 3 (KAP3) in *Trypanosoma cruzi*: effect on kinetoplast organization, cell proliferation and differentiation. **Mol Biochem Parasitol**, v. 172, n. 2, p. 90-98, ago. 2010.
- DEGRASSE, J. A et al. Evidence for a shared nuclear pore complex architecture that is conserved from the last common eukaryotic ancestor. **Mol Cell Proteomics**, v. 8, n. 9, p. 2119-2130, set. 2009.
- DEL PRIORE, V. et al. A structure/function analysis of Rat7p/Nup159p, an essential nucleoporin of *Saccharomyces cerevisiae*. **J Cell Sci**, v. 110, n. Pt23, p. 2987-2999, dez. 1997.
- DELHI, P. et al. Is there a classical nonsense-mediated decay pathway in trypanosomes? **PLoS One**, v. 6, n. 9, p. e25112, jan. 2011.
- DONG, X. et al. Structural basis for leucine-rich nuclear export signal recognition by CRM1. **Nature**, v. 458, n. 7242, p. 1136-1141, 30 abr. 2009.
- DONIGER, T. et al. A comparative genome-wide study of ncRNAs in trypanosomatids. **BMC genomics**, v. 11, n. 1, p. 615, jan. 2010.
- DOSTALOVA, A. et al. The nuclear mRNA export receptor Mex67-Mtr2 of *Trypanosoma brucei* contains a unique and essential zinc finger motif. **Mol Microbiol**, v. 88, n. 4, p. 728-739, maio 2013.
- DUMAS, C. et al. A novel class of developmentally regulated noncoding RNAs in *Leishmania*. **Eukaryot Cell**, v. 5, n. 12, p. 2033-2046, dez. 2006.
- EDDY, S. R. Profile hidden Markov models. **Bioinformatics**, v. 14, n. 9, p. 755-763, 1998.
- EDGAR, R. C. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. **Nucleic Acids Res**, v. 32, n. 5, p. 1792-7, jan. 2004.
- EL-SAYED, N. M. et al. The Genome Sequence of *Trypanosoma cruzi*, Etiologic Agent of Chagas Disease. **Science**, v. 309, n. 5733, p. 409-415, 2005.

- ERBEN, E.; CHAKRABORTY, C.; CLAYTON, C. The CAF1-NOT complex of trypanosomes. **Front Genet**, v. 4, p. 299, jan. 2014.
- ESPINOSA, J. Trypanosoma cruzi poly-zinc finger protein: a novel DNA/RNA-binding CCHC-zinc finger protein. **Mol Biochem Parasitol**, v. 131, n. 1, p. 35-44, set. 2003.
- ESTÉVEZ, A. M. The RNA-binding protein TbDRBD3 regulates the stability of a specific subset of mRNAs in trypanosomes. **Nucleic Acids Res**, v. 36, n. 14, p. 4573-4586, ago. 2008.
- ESTRUCH, F.; COLE, C. N. An early function during transcription for the yeast mRNA export factor Dbp5p/Rat8p suggested by its genetic and physical interactions with transcription factor IIH components. **Mol Cell Biol**, v. 14, n. 4, p. 1664-1676, 2003.
- FERRAIUOLO, M. A et al. A nuclear translation-like factor eIF4AIII is recruited to the mRNA during splicing and functions in nonsense-mediated decay. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 101, n. 12, p. 4118-4123, 23 mar. 2004.
- FIELD, M. C. et al. Proteomics on the rims: insights into the biology of the nuclear envelope and flagellar pocket of trypanosomes. **Parasitology**, v. 139, n. 9, p. 1158-1167, ago. 2012.
- FINN, R. D. et al. Pfam: the protein families database. **Nucleic Acids Res**, v. 42, n. Database issue, p. D222-30, jan. 2014.
- FISCHER, T. et al. The mRNA export machinery requires the novel Sac3p - Thp1p complex to dock at the nucleoplasmic entrance of the nuclear pores. **EMBO J**, v. 21, n. 21, p. 5843-5852, 2002.
- FORNEROD, M. et al. CRM1 Is an Export Receptor for Leucine-Rich. **Cell**, v. 90, n. 6, p. 1051-1060, 1997.
- FRIBOURG, S. et al. Structural Basis for the Recognition of a Nucleoporin FG Repeat by the NTF2-like Domain of the TAP / p15 mRNA Nuclear Export Factor. **Mol Cell**, v. 8, n. 3, p. 645-656, 2001.

- FRIDY, P. C. et al. A robust pipeline for rapid production of versatile nanobody repertoires. **Nat Methods**, v. 11, n. 12, p. 1253-1260, 2 nov. 2014.
- FU, S.; IMAI, K.; HORTON, P. Prediction of leucine-rich nuclear export signal containing proteins with NESsential. **Nucleic Acids Res**, v. 39, n. 16, p. 1-12, 2011.
- GATFIELD, D. et al. The DExH/D box protein HEL/UAP56 is essential for mRNA nuclear export in Drosophila. **Curr Biol**, v. 11, n. 21, p. 1716-1721, 2001.
- GATFIELD, D.; IZAURRALDE, E. REF1/Aly and the additional exon junction complex proteins are dispensable for nuclear mRNA export. **J Cell Biol**, v. 159, n. 4, p. 579-588, 25 nov. 2002.
- GAZESTANI, V. H.; LU, Z.; SALAVATI, R. Deciphering RNA regulatory elements in trypanosomatids: one piece at a time or genome-wide? **Trends Parasitol**, v. 30, n. 5, p. 234-240, maio 2014.
- GEHRING, N. H. et al. Y14 and hUpf3b Form an NMD-Activating Complex. **Mol Cell**, v. 11, n. 4, p. 939-949, 2003.
- GEHRING, N. H. et al. Disassembly of exon junction complexes by PYM. **Cell**, v. 137, n. 3, p. 536-548, 1 maio 2009.
- GENTIL, L. G. et al. Posttranscriptional mechanisms involved in the control of expression of the stage-specific GP82 surface glycoprotein in Trypanosoma cruzi. **Acta Trop**, v. 109, n. 2, p. 152-158, fev. 2009.
- GILBERT, W.; SIEBEL, C. W.; GUTHRIE, C. Phosphorylation by Sky1p promotes Npl3p shuttling and mRNA dissociation. **RNA**, v. 7, n. 2, p. 302-313, 2001.
- GLISOVIC, T. et al. RNA-binding proteins and post-transcriptional gene regulation. **FEBS Lett**, v. 582, n. 14, p. 1977-1986, 2008.
- GRADIA, D. F. et al. Characterization of a novel Obg-like ATPase in the protozoan Trypanosoma cruzi. **Int J Parasitol**, v. 39, n. 1, p. 49-58, jan. 2009.
- GROSS, T. et al. The DEAD-Box RNA Helicase Dbp5 Functions in Translation Termination. **Science**, v. 315, n. 5812, p. 646-649, 2007.

- HAJDUK, S.; OCHSENREITER, T. RNA editing in kinetoplastids. **RNA Biol**, v. 7, n. 2, p. 229-236, 27 out. 2010.
- HAMILTON, P. B.; TEIXEIRA, M. M. G.; STEVENS, J. R. The evolution of *Trypanosoma cruzi*: the “bat seeding” hypothesis. **Trends in parasitology**, v. 28, n. 4, p. 136-141, abr. 2012.
- HAN, B.-G. et al. Helical repeat structure of apoptosis inhibitor 5 reveals protein-protein interaction modules. **J Biol Chem**, v. 287, n. 14, p. 10727-10737, 30 mar. 2012.
- HEROLD, A.; TEIXEIRA, L.; IZAURRALDE, E. Genome-wide analysis of nuclear mRNA export pathways in *Drosophila*. **EMBO J**, v. 22, n. 10, p. 2472-2483, 2003.
- HIR, H. LE et al. The spliceosome deposits multiple proteins 20-24 nucleotides upstream of mRNA exon-exon junctions. **EMBO J**, v. 19, n. 24, 2000.
- HIR, H. LE et al. The protein Mago provides a link between splicing and mRNA localization. **EMBO Rep**, v. 2, n. 12, p. 1119-1124, 2001a.
- HIR, H. LE et al. The exon-exon junction complex provides a binding platform for factors involved in mRNA export and nonsense-mediated mRNA decay. **EMBO J**, v. 20, n. 17, p. 4987-4997, 2001b.
- HODGE, C. A. et al. Rat8p / Dbp5p is a shuttling transport factor that interacts with Rat7p / Nup159p and Gle1p and suppresses the mRNA export defect of xpo1-1 cells. **EMBO J**, v. 18, n. 20, p. 5778-5788, 1999.
- HOFMANN, I. et al. Symplekin , a Constitutive Protein of Karyo- and Cytoplasmic Particles Involved in mRNA Biogenesis in *Xenopus laevis* Oocytes. **Mol Biol Cell**, v. 13, n. 5, p. 1665-1676, 2002.
- HOLETZ, F. B. et al. Evidence of P-body-like structures in *Trypanosoma cruzi*. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 356, n. 4, p. 1062-1067, 18 maio 2007.
- HUANG, Y. et al. SR Splicing Factors Serve as Adapter Proteins for TAP-Dependent mRNA Export. **Mol Cell**, v. 11, n. 3, p. 837-843, 2003.

- HUERTAS, P.; AGUILERA, A. Cotranscriptionally Formed DNA : RNA Hybrids Mediate Transcription Elongation Impairment and Transcription-Associated Recombination. **Mol Cell**, v. 12, n. 3, p. 711-721, 2003.
- INOUE, A. H. et al. Identification of a novel nucleocytoplasmic shuttling RNA helicase of trypanosomes. **PLoS One**, v. 9, n. 10, p. e109521, jan. 2014.
- ISHIHAMA, Y. et al. Exponentially modified protein abundance index (emPAI) for estimation of absolute protein amount in proteomics by the number of sequenced peptides per protein. **Mol Cell Proteomics**, v. 4, n. 9, p. 1265-1272, set. 2005.
- ISKEN, O.; MAQUAT, L. E. Quality control of eukaryotic mRNA : safeguarding cells from abnormal mRNA function. **Genes Dev**, v. 21, n. 15, p. 1833-1857, 2007.
- JÄGER, A. V; MUIÁ, R. P.; CAMPETELLA, O. Stage-specific expression of *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase involves highly conserved 3' untranslated regions. **FEMS Microbiol Lett**, v. 283, n. 2, p. 182-188, jun. 2008.
- JIMENO, S. et al. The yeast THO complex and mRNA export factors link RNA metabolism with transcription and genome instability. **EMBO J**, v. 21, n. 13, p. 3526±353, 2002.
- JOHNSON, P. J. et al. Inactivation of Transcription by UV Irradiation of *T. brucei* Provides Evidence for a Multicistronic Transcription Unit Including a VSG Gene. **Cell**, v. 51, n. 2, p. 273-281, 1987.
- KATAOKA, N. et al. Pre-mRNA Splicing Imprints mRNA in the Nucleus with a Novel RNA-Binding Protein that Persists in the Cytoplasm. **Mol Cell**, v. 6, n. 3, p. 673-682, 2000.
- KEENE, J. D. RNA regulons: coordination of post-transcriptional events. **Nat Rev Genet**, v. 8, n. 7, p. 533-543, jul. 2007.
- KELLEY, L. A; STERNBERG, M. J. E. Protein structure prediction on the Web: a case study using the Phyre server. **Nat Protoc**, v. 4, n. 3, p. 363-731, jan. 2009.

- KÖHLER, A.; HURT, E. Exporting RNA from the nucleus to the cytoplasm. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 8, n. 10, p. 761-773, 2007.
- KRAMER, S.; CARRINGTON, M. Trans-acting proteins regulating mRNA maturation, stability and translation in trypanosomatids. **Trends Parasitol**, v. 27, n. 1, p. 23-30, jan. 2011.
- KRAMER, S.; KIMBLIN, N. C.; CARRINGTON, M. Genome-wide in silico screen for CCCH-type zinc finger proteins of *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania major*. **BMC Genomics**, v. 11, n. 283, 2010.
- LA COUR, T. NESbase version 1.0: a database of nuclear export signals. **Nucleic Acids Res**, v. 31, n. 1, p. 393-396, 1 jan. 2003.
- LA COUR, T. et al. Analysis and prediction of leucine-rich nuclear export signals. **Protein Eng Des Sel**, v. 17, n. 6, p. 527-536, jun. 2004.
- LAEMMLI, U. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680-685, 1970.
- LEE, M. G.; PLOEG, L. H. T. VAN DER. TRANSCRIPTION OF PROTEIN-CODING GENES IN TRYPANOSOMES BY RNA POLYMERASE I. **Annu Rev Microbiol**, v. 51, p. 463-489., 1997.
- LEE, M. S.; HENRY, M.; PAMELA, A. A protein that shuttles between the nucleus and the cyto ~ lasm is an important mediator ; of RNA export. **Genes & Dev**, v. 10, p. 1233-1246, 1996.
- LEPPEK, K.; STOECKLIN, G. An optimized streptavidin-binding RNA aptamer for purification of ribonucleoprotein complexes identifies novel ARE-binding proteins. **Nucleic Acids Res**, v. 42, n. 2, p. e13, jan. 2014.
- LINDER, P. Dead-box proteins: a family affair--active and passive players in RNP-remodeling. **Nucleic Acids Res**, v. 34, n. 15, p. 4168-4180, jan. 2006.
- LIU, H.; SADYGOV, R. G.; YATES, J. R. A model for random sampling and estimation of relative protein abundance in shotgun proteomics. **Anal Chem**, v. 76, n. 14, p. 4193-4201, 2004.

- LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402-408, dez. 2001.
- LUNA, R. et al. Biogenesis of mRNPs: integrating different processes in the eukaryotic nucleus. **Chromosoma**, v. 117, n. 4, p. 319-331, ago. 2008.
- LUND, M. K.; GUTHRIE, C. The DEAD-Box Protein Dbp5p Is Required to Dissociate Mex67p from Exported mRNPs at the Nuclear Rim. **Mol Cell**, v. 20, n. 4, p. 645-651, 2005.
- LUO, M. et al. Pre-mRNA splicing and mRNA export linked by direct interactions between UAP56 and Aly. **Nature**, v. 413, n. 6856, p. 644-647, 2001.
- MAHADEVAN, K. et al. RanBP2/Nup358 potentiates the translation of a subset of mRNAs encoding secretory proteins. **PLoS Biol**, v. 11, n. 4, p. e1001545, jan. 2013.
- MANS, B. et al. Comparative Genomics, Evolution and Origins of the Nuclear Envelope and Nuclear Pore Complex. **Cell Cycle**, v. 3, n. 12, p. 1612-1637, 27 out. 2004.
- MARTÍNEZ-CALVILLO, S. et al. Transcription of *Leishmania major* Friedlin Chromosome 1 Initiates in Both. **Mol Cell**, v. 11, n. 5, p. 1291-1299, 2003.
- MASUDA, S. et al. Recruitment of the human TREX complex to mRNA during splicing. **Genes Dev**, v. 19, n. 13, p. 1512-1517, 2005.
- MAYA, J. D. et al. Mode of action of natural and synthetic drugs against *Trypanosoma cruzi* and their interaction with the mammalian host. **Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol.**, v. 146, n. 4, p. 601-20, maio 2007.
- McANDREW, M. et al. Testing Promoter Activity in the Trypanosome Genome : Isolation of a Metacyclic-Type VSG Promoter , and Unexpected Insights into RNA Polymerase II Transcription. **Exp Parasitol Parasitol**, v. 76, n. 90, p. 65-76, 1998.

- MEDINA-ACOSTA, E.; CROSS, G. A. M. Rapid isolation of DNA from trypanosomatid protozoa using a simple 'mini-prep' procedure. **Mol Biochem Parasitol**, v. 59, n. 2, p. 327-329, 1993.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. Doença de Chagas. Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/secretarias/svs/doenca-de-chagas>>. Acesso em: 01 jan. 2015.
- MÖRKING, P. A et al. TcZFP1: a CCCH zinc finger protein of *Trypanosoma cruzi* that binds poly-C oligoribonucleotides in vitro. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 319, n. 1, p. 169-177, 18 jun. 2004.
- MUYLDERMANS, S. Nanobodies: natural single-domain antibodies. **Annu Rev Biochem**, v. 82, p. 775-797, jan. 2013.
- MYUNG, K. S. et al. Comparison of the post-transcriptional regulation of the mRNAs for the surface proteins PSA (GP46) and MSP (GP63) of *Leishmania chagasi*. **J Biol Chem**, v. 277, n. 19, p. 16489-16497, 10 maio 2002.
- NAKIELNY, S.; DREYFUSS, G. Transport of Proteins and RNAs in and out of the Nucleus Eukaryotic cells are equipped with a machinery charged. **Cell**, v. 99, n. 7, p. 677-690, 1999.
- NEUMANN, N.; LUNDIN, D.; POOLE, A. M. Comparative genomic evidence for a complete nuclear pore complex in the last eukaryotic common ancestor. **PloS One**, v. 5, n. 10, p. e13241, jan. 2010.
- NEVILLE, M.; ROSBASH, M. The NES – Crm1p export pathway is not a major mRNA export route in *Saccharomyces cerevisiae*. **EMBO J**, v. 18, n. 13, p. 3746-3756, 1999.
- NOÉ, G.; DE GAUDENZI, J. G.; FRASCH, A. C. Functionally related transcripts have common RNA motifs for specific RNA-binding proteins in trypanosomes. **BMC Mol Biol**, v. 9, p. 107, jan. 2008.
- NOIA, J. M. DI et al. AU-rich Elements in the 3'-Untranslated Region of a New Mucin-type Gene Family of *Trypanosoma cruzi* Confers mRNA Instability and

- Modulates Translation Efficiency. **J Biol Chem**, v. 275, n. 14, p. 10218-10227, 2000.
- NOJIMA, T. et al. The interaction between cap-binding complex and RNA export factor is required for intronless mRNA export. **J Biol Chem**, v. 282, n. 21, p. 15645-15651, 25 maio 2007.
- NOTT, A.; HIR, H. LE; MOORE, M. J. Splicing enhances translation in mammalian cells: an additional function of the exon junction complex. **Genes Dev**, v. 18, n. 2, p. 210-222, 2004.
- OEFFINGER, M. et al. Comprehensive analysis of diverse ribonucleoprotein complexes. **Nat Methods**, v. 4, n. 11, p. 951-956, 2007.
- OLSEN, J. V et al. Parts per million mass accuracy on an Orbitrap mass spectrometer via lock mass injection into a C-trap. **Mol Cell Proteomics**, v. 4, n. 12, p. 2010-2021, dez. 2005.
- PALACIOS, I. M. et al. An eIF4AIII-containing complex required for mRNA localization and nonsense-mediated mRNA decay. **Nature**, v. 427, n. 6976, p. 753-757, 2004.
- PALAZZO, A. F. et al. The signal sequence coding region promotes nuclear export of mRNA. **PLoS Biol**, v. 5, n. 12, p. e322, dez. 2007.
- PARSONS, M. et al. Trypanosome mRNAs Share a Common 5' Spliced Leader Sequence. **Cell**, v. 38, n. 1, p. 309-316, 1984.
- PAWLOWSKI, J. Protist Evolution and Phylogeny. In: **eLS**. [s.l.] John Wiley & Sons, Ltd, 2014. p. 1-9.
- PREUSSE, C.; JAÉ, N.; BINDEREIF, A. mRNA splicing in trypanosomes. **Int J Med Microbiol**, v. 302, n. 4-5, p. 221-224, out. 2012.
- PRICE, M. N.; DEHAL, P. S.; ARKIN, A. P. FastTree 2--approximately maximum-likelihood trees for large alignments. **PloS One**, v. 5, n. 3, p. e9490, jan. 2010.

- RASSI, A. J.; RASSI, A.; MARIN-NETO, J. A. Chagas disease. **Lancet**, v. 375, n. 9723, p. 1388-1402, 17 abr. 2010.
- REDMOND, S.; VADIVELU, J.; FIELD, M. C. RNAi: an automated web-based tool for the selection of RNAi targets in *Trypanosoma brucei*. **Mol Biochem Parasitol**, v. 128, n. 1, p. 115-118, 25 abr. 2003.
- RICE, P. The European Molecular Biology Open Software Suite EMBOSS : The European Molecular Biology Open Software Suite. **Trends Genet**, v. 16, n. 6, p. 276-277, 2000.
- RODRIGUES, D. C. et al. *Trypanosoma cruzi*: modulation of HSP70 mRNA stability by untranslated regions during heat shock. **Exp Parasitol**, v. 126, n. 2, p. 245-253, out. 2010.
- ROLLENHAGEN, C.; HODGE, C. A.; COLE, C. N. The Nuclear Pore Complex and the DEAD Box Protein Rat8p / Dbp5p Have Nonessential Features Which Appear To Facilitate mRNA Export following Heat Shock. **Mol Cell Biol**, v. 24, n. 11, p. 4869-4879, 2004.
- RONDÓN, A. G. et al. Molecular evidence for a positive role of Spt4 in transcription elongation. **EMBO J**, v. 22, n. 3, p. 612-620, 2003.
- ROUT, M. P. et al. The Yeast Nuclear Pore Complex : Composition , Architecture , and Transport Mechanism. **J Cell Biol**, v. 148, n. 4, p. 635-651, 2000.
- RUDENKO, G. et al. RNA polymerase I can mediate expression of CAT and neo protein-coding genes in *Trypanosoma brucei*. **EMBO J**, v. 10, n. 11, p. 3387-3397, 1991.
- RUDENKO, G.; BLUNDELL, P. A.; DIRKS-MULDER, A. A ribosomal DNA promoter replacing the promoter of a telomeric VSG gene expression site can be efficiently switched on and off in *T. brucei*. **Cell**, v. 83, n. 4, p. 547-553, 1995.
- SAMBROOK, J.; RUSSEL, D.W. **Molecular cloning: a laboratory manual**. Cold Spring Harbor Laboratory, 3th ed., 2001.

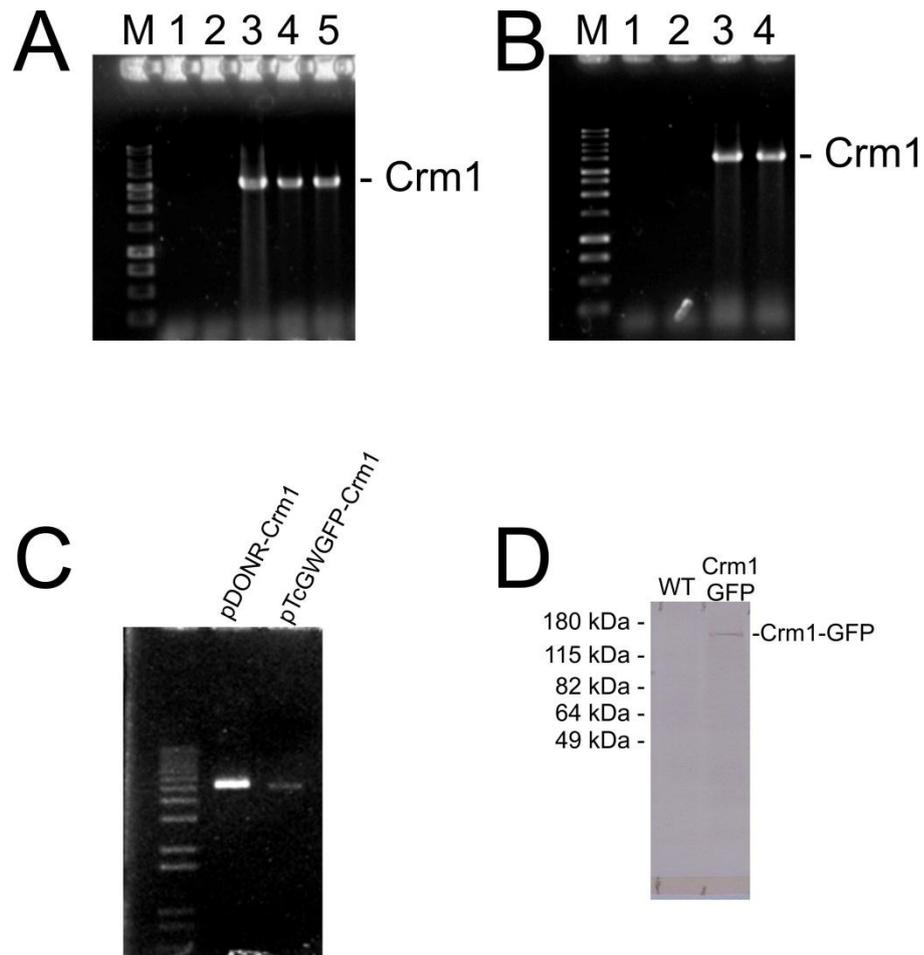
- SAMUEL, M. A et al. Multifunctional arm repeat domains in plants. **Int Rev Cytol**, v. 253, p. 1-26, jan. 2006.
- SCHÜTZ, S. et al. Stimulated expression of mRNAs in activated T cells depends on a functional CRM1 nuclear export pathway. **J Mol Biol**, v. 358, n. 4, p. 997-1009, 12 maio 2006.
- SCHWEDE, A. et al. The role of deadenylation in the degradation of unstable mRNAs in trypanosomes. **Nucleic Acids Res**, v. 37, n. 16, p. 5511-28, set. 2009.
- SEGREF, A. et al. Mex67p , a novel factor for nuclear mRNA export , binds to both poly (A) * RNA and nuclear pores. **EMBO J**, v. 16, n. 11, p. 3256-3271, 1997.
- SERPELONI, M. et al. An Essential Nuclear Protein in Trypanosomes Is a Component of mRNA Transcription/Export Pathway. **PLoS One**, v. 6, n. 6, p. e20730, 2011a.
- SERPELONI, M. et al. Comparative genomics of proteins involved in RNA nucleocytoplasmic export. **BMC Evol Biol**, v. 11, n. 1, p. 7, 2011b.
- SHAMSHER, M. K.; PLOSKI, J.; RADU, A. Karyopherin κ 2B participates in mRNA export from the nucleus. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 99, n. 22, p. 14195–14199, 2002.
- SHIBUYA, T. et al. eIF4AIII binds spliced mRNA in the exon junction complex and is essential for nonsense-mediated decay. **Nat Struct Mol Biol**, v. 11, n. 4, p. 346-351, abr. 2004.
- SINGH, N. et al. Differential gene expression analysis in antimony-unresponsive Indian kala azar (visceral leishmaniasis) clinical isolates by DNA microarray. **Parasitology**, v. 134, n. Pt 6, p. 777-787, jun. 2007.
- SMYTH, G. K. limma: Linear Models for Microarray Data. In: GENTLEMAN, R. et al. (Eds.). **Bioinformatics and Computational Biology Solutions Using R and Bioconductor**. [s.l.] Springer New York, 2005. p. 397-420.

- SNAY-HODGE, C. A. et al. Dbp5p / Rat8p is a yeast nuclear pore-associated DEAD-box protein essential for RNA export. **EMBO J**, v. 17, n. 9, p. 2663-2676, 1998.
- STERN, M. Z. et al. Multiple roles for polypyrimidine tract binding (PTB) proteins in trypanosome RNA metabolism. **RNA**, v. 15, n. 4, p. 648-665, 2009.
- STEVERDING, D. The history of Chagas disease. **Parasites & vectors**, v. 7, n. 317, p. 1-8, jan. 2014.
- STEWART, M. Ratcheting mRNA out of the nucleus. **Mol Cell**, v. 25, n. 3, p. 327-330, 9 fev. 2007.
- STRAMBIO-DE-CASTILLIA, C.; NIEPEL, M.; ROUT, M. P. The nuclear pore complex: bridging nuclear transport and gene regulation. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 11, n. 7, p. 490-501, jul. 2010.
- STRÄSSER, K.; HURT, E. Splicing factor Sub2p is required for nuclear mRNA export through its interaction with Yra1p. **Nature**, v. 413, n. 6856, p. 648-652., 2001.
- STUART, K. et al. RNA Editing in Kinetoplastid Protozoa. **Microbiol Mol Biol Rev**, v. 61, n. 1, p. 105-120, 1997.
- TANGE, T. Ø. et al. Biochemical analysis of the EJC reveals two new factors and a stable tetrameric protein core. **RNA**, v. 11, n. 12, p. 1869-1883, 2005.
- TANGE, T. Ø.; NOTT, A.; MOORE, M. J. The ever-increasing complexities of the exon junction complex. **Curr Opin Cell Biol**, v. 16, n. 3, p. 279-284, jun. 2004.
- TEWARI, R. et al. Armadillo-repeat protein functions: questions for little creatures. **Trends Cell Biol**, v. 20, n. 8, p. 470-481, ago. 2010.
- TRAN, E. J.; WENTE, S. R. Dynamic nuclear pore complexes: life on the edge. **Cell**, v. 125, n. 6, p. 1041-1053, 16 jun. 2006.
- TSENG, S. et al. Dbp5p, a cytosolic RNA helicase, is required for poly(A)⁺ RNA export. **EMBO J**, v. 17, n. 9, p. 2651-2662, 1 maio 1998.

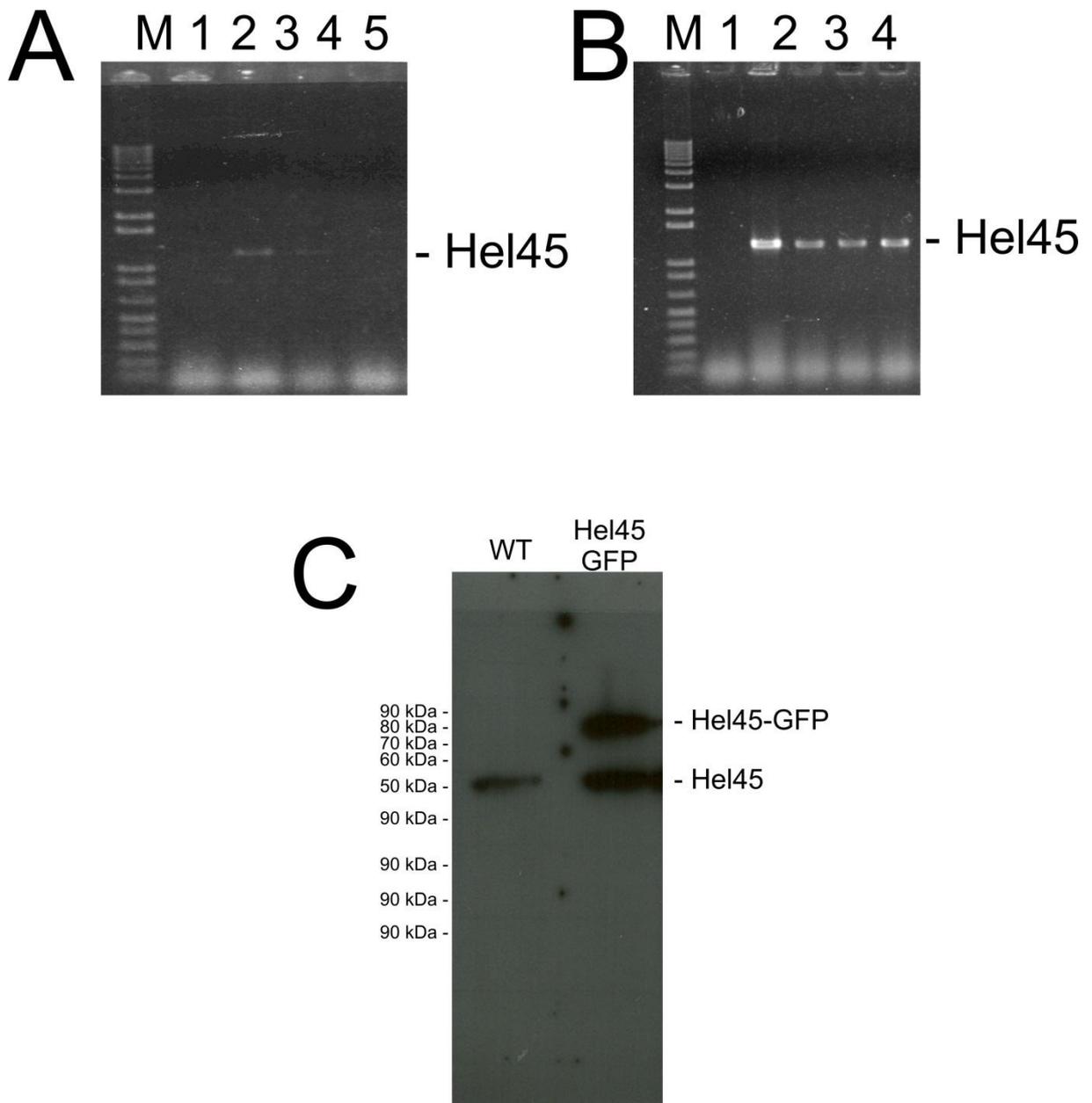
- TYLER, K. M.; ENGMAN, D. M. The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited. **Int J Parasitol**, v. 31, n. 5-6, p. 472-481, 2001.
- VALDÉS, J. et al. Proteomic analysis of *Entamoeba histolytica* in vivo assembled pre-mRNA splicing complexes. **J Proteomics**, v. 111, p. 30-45, 5 dez. 2014.
- VAN DIJK, T. B. et al. Friend of Prmt1, a novel chromatin target of protein arginine methyltransferases. **Mol Cell Biol**, v. 30, n. 1, p. 260-272, jan. 2010.
- VILLARREAL, D. et al. Differential Gene Expression in Benzimidazole-Resistant *Trypanosoma cruzi* Parasites. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 49, n. 7, p. 2701-2709, 2005.
- WATANABE, M. et al. Involvement of CRM1, a nuclear export receptor, in mRNA export in mammalian cells and fission yeast. **Genes Cells**, v. 4, n. 5, p. 291-297, maio 1999.
- WEIS, K. Nucleocytoplasmic transport: cargo trafficking across the border. **Curr Opin Cell Biol**, v. 14, n. 3, p. 328-335, 2002.
- WESTON, D.; FLAMME, A. C. LA; VOORHIS, W. C. VAN. Expression of *Trypanosoma cruzi* surface antigen FL-160 is controlled by elements in the 3' untranslated , the 3' intergenic , and the coding regions. **Mol Biochem Parasitol**, v. 102, n. 1, p. 53-66, 1999.
- WICKSTEAD, B.; ERSFELD, K.; GULL, K. Targeting of a tetracycline-inducible expression system to the transcriptionally silent minichromosomes of *Trypanosoma brucei*. **Mol Biochem Parasitol**, v. 125, n. 1-2, p. 211-216, 2002.
- WIRTZ, E. et al. A tightly regulated inducible expression system for conditional gene knock-outs and dominant-negative genetics in *Trypanosoma brucei*. **Mol Biochem Parasitol**, v. 99, n. 1, p. 89-101, 15 mar. 1999.
- WIŚNIEWSKI, J. R. et al. Universal sample preparation method for proteome analysis. **Nat Methods**, v. 6, n. 5, p. 359 - 362, 2009.

- XIANG, K. et al. Crystal structure of the human symplekin-Ssu72-CTD phosphopeptide complex. **Nature**, v. 467, n. 7316, p. 729-733, 2010.
- YAN, S. et al. Characterization of the Leishmania dono6ani ribosomal RNA promoter. **Mol Biochem Parasitol**, v. 103, n. 2, p. 197-210, 1999.
- ZAMUDIO, J. R. et al. Hypermethylated cap 4 maximizes Trypanosoma brucei translation. **Mol Microbiol**, v. 72, n. 5, p. 1100-1110, 2009.
- ZEINER, G. M.; STURM, N. R.; CAMPBELL, D. A. Exportin 1 Mediates Nuclear Export of the Kinetoplastid Spliced Leader RNA. **Eukaryot Cell**, v. 2, n. 2, p. 222-230, 2003.
- ZENKLUSEN, D. et al. Stable mRNP Formation and Export Require Cotranscriptional Recruitment of the mRNA Export Factors Yra1p and Sub2p by Hpr1p. **Mol Cell Biol**, v. 22, n. 23, p. 8241-8253, 2002.
- ZHAO, J. et al. The mRNA export factor Dbp5 is associated with Balbiani ring mRNP from gene to cytoplasm. **EMBO J**, v. 21, n. 5, p. 1177-1187, 2002.
- ZOMERDIJK, J. C. B. M.; KIEFT, R.; BORST, P. Efficient production of functional mRNA mediated by RNA polymerase I in Trypanosoma brucei. **Nature**, v. 353, n. 6346, p. 772-775, 1991.

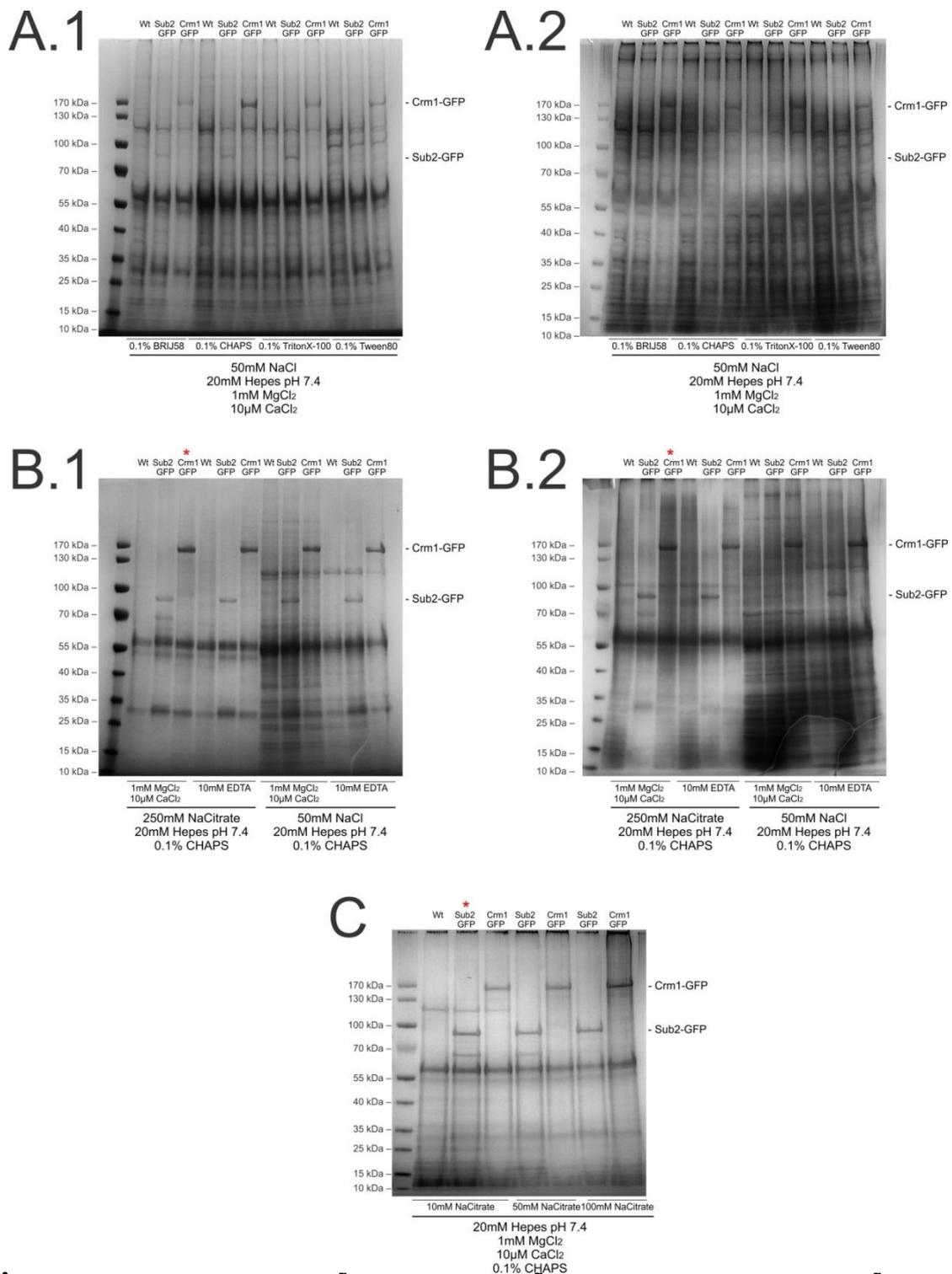
7. APÊNDICES



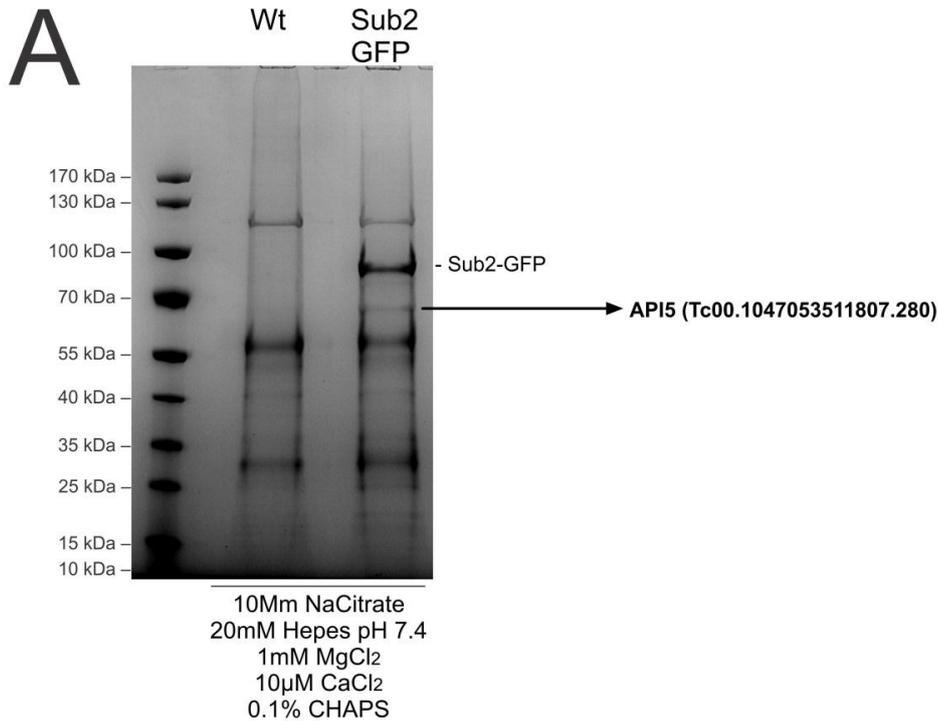
APÊNDICE A – CLONAGEM DO GENE DE Crm1. Confirmação da clonagem do gene de Crm1 por PCR de colônia no vetor de entrada pDONR221 (em A) e vetor de destino pTcGWGFP (em B). Os plasmídeos recombinantes foram isolados e o resultado da Minipreparação está representado na figura (C). Análise por eletroforese em gel de agarose 1% corado em brometo de etídeo 0,5 µg/ml. Marcador molecular = 1 Kb plus DNA Ladder (Invitrogen). A clonagem foi confirmada com a amplificação de um fragmento de 3105 pb por PCR e, em seguida, por sequenciamento. (D) Após transfecção de *T. cruzi* com o vetor pTcGWGFP-Crm1 e seleção dos parasitas, o extrato proteico total foi submetido à análise de expressão de Crm1 fusionada a GFP por Western blot utilizando anticorpo anti-GFP (1:1000, produzido em camundongo). Como controle, foi utilizado o extrato do parasita selvagem (WT). Como a proteína nativa apresenta 117 kDa, assim, uma banda próxima ao tamanho esperado de Crm1 fusionada a GFP foi observada no extrato do parasita transfectante.



APÊNDICE B – CLONAGEM DO GENE DE Hel45. Confirmação da clonagem do gene de Hel45 por PCR de colônia no vetor de entrada pDONR221 (em A) e vetor de destino pTcGWGFP (em B). Análise por eletroforese em gel de agarose 1% corado em brometo de etídeo 0,5 µg/ml. Marcador molecular = 1 Kb plus DNA Ladder (Invitrogen). A clonagem foi confirmada com a amplificação de um fragmento em torno de 1200 pb, correspondente ao gene, além do sequenciamento. (C) Após transfecção de *T. cruzi* com o vetor pTcGWGFP-Hel45 e seleção dos parasitas, o extrato proteico total do transfectante foi submetido à análise de expressão de Hel45 fusionada a GFP por *Western blot* utilizando anticorpo anti-Hel45 (1:500, produzido em camundongo). Como controle, foi utilizado o extrato do parasita selvagem (WT). Tanto a proteína nativa, 45 kDa, quanto a fusionada com GFP foram evidenciadas na análise por *Western blot*.



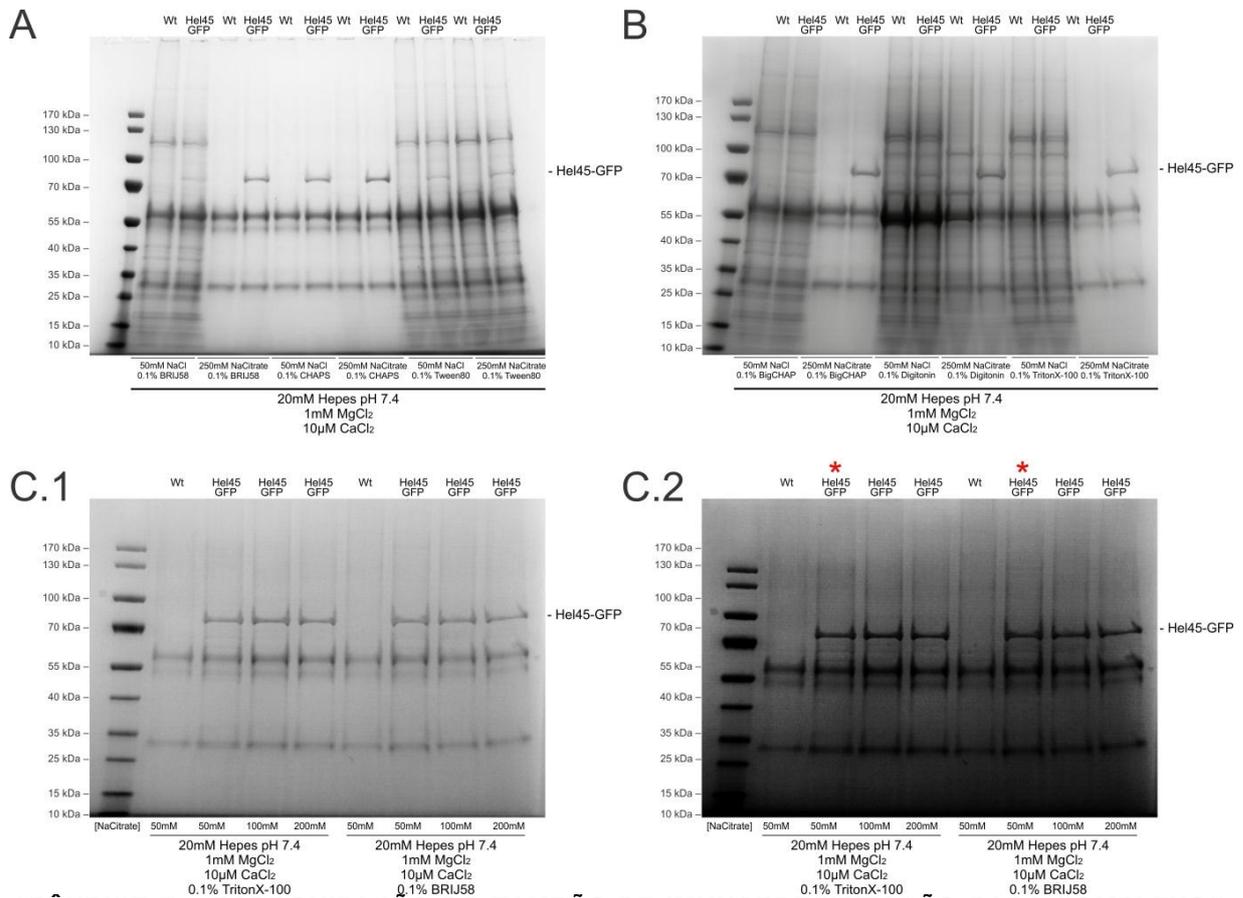
APÊNDICE C – PADRONIZAÇÃO DOS TAMPOES DE IMUNOPRECIPITAÇÃO PARA COMPLEXOS CONTENDO AS PROTEÍNAS Sub2 E Crm1. Em A, foram testados diferentes detergentes em tampão contendo NaCl como sal. Em B, foram testados diferentes sais (NaCl e NaCitrate), em alta concentração; além de EDTA. Na concentração alta de sal, NaCitrate 250 mM algumas bandas diferenciadas das IP com extrato de parasita selvagem foram evidenciadas para Crm1 (* em vermelho em B.1). Assim, o tampão mais adequado as análises de Crm1 continha: citrato de sódio 250mM; Hepes pH 7,4 20mM; MgCl₂ 1mM; CaCl₂ 10 µM; e CHAPS 0,1%. Em C, foram testados concentrações decrescentes de sal NaCitrate, evidenciando o aparecimento de bandas diferenciadas na IP para Sub2 e demonstrando que essa proteína estabiliza melhor seus complexos em baixa concentração de sal (* vermelho em C). A condição estabelecida para Sub2 foi citrato de sódio 10mM; Hepes pH 7,4 20mM; MgCl₂ 1mM; CaCl₂ 10 µM; e CHAPS 0,1%. A.1 e B.1 – Gel NuPAGE® Novex® 4-12% Bis-Tris (Life Technologies) corado kit Staining with SimplyBlue™ SafeStain (Life technologies). A.2 e B.2 – Mesmo gel de A.1 e B.1 corado com kit com kit SilverQuest™ Silver Staining Kit (Life technologies).



B

Description	Accession	Score	Mass	Matches	Pep(sig)	Sequences	Seq(sig)	%mpAI
Uncharacterized protein OS=Trypanosoma cruzi Dm28c GN=TCMDM_06825 PE=4 SV=1	tr V5BFQ6 V5BFQ6_TRYCR	1996	61450	48	48	31	31	7.47
RNA helicase, putative OS=Trypanosoma cruzi GN=TCYLVIO_009350 PE=4 SV=1	tr K4DNQ1 K4DNQ1_TRYCR	1045	49773	30	30	22	22	5.28
Chaperonin HSP60, mitochondrial, putative OS=Trypanosoma cruzi marinkellei GN=MOQ_003716 PE=3 SV=1	tr K2NC28 K2NC28_TRYCR	1358	59630	27	27	23	23	2.99
Poly(A)-binding protein, putative, polyadenylate-binding protein, putative OS=Trypanosoma cruzi marinkellei GN=MOQ_004370 PE=4 SV=1	tr K2N1D5 K2N1D5_TRYCR	687	61656	25	25	22	22	2.46
Uncharacterized protein OS=Trypanosoma cruzi Dm28c GN=TCMDM_07317 PE=4 SV=1	tr V5BAA2 V5BAA2_TRYCR	641	64211	19	19	17	17	1.47
Uncharacterized protein OS=Trypanosoma cruzi GN=TCYLVIO_005508 PE=4 SV=1	tr K4D256 K4D256_TRYCR	375	59531	17	17	17	17	1.39
Chaperonin, putative, T-complex protein 1, theta subunit, putative OS=Trypanosoma cruzi marinkellei GN=TCYLVIO_004584 PE=3 SV=1	tr K4E2E8 K4E2E8_TRYCR	328	58343	11	11	11	11	0.78
Chaperonin/T-complex protein 1 gamma subunit, putative OS=Trypanosoma cruzi marinkellei GN=MOQ_009429 PE=3 SV=1	tr K2MWX4 K2MWX4_TRYCR	268	61324	11	11	11	11	0.73
Pyruvate phosphate dikinase 1 OS=Trypanosoma cruzi GN=ppdk2 PE=4 SV=1	tr Q9GN79 Q9GN79_TRYCR	519	101605	17	17	16	16	0.67
Uncharacterized protein OS=Trypanosoma cruzi GN=TCYLVIO_002064 PE=4 SV=1	tr K4E8S3 K4E8S3_TRYCR	159	57452	6	6	6	6	0.38
Chaperonin HSP60/CNP60, putative OS=Trypanosoma cruzi marinkellei GN=MOQ_002028 PE=3 SV=1	tr K2NET2 K2NET2_TRYCR	200	58060	6	6	6	6	0.37
Elongation factor 1-alpha (Fragment) OS=Trypanosoma cruzi GN=EF-1alpha PE=3 SV=1	tr Q0IK13 Q0IK13_TRYCR	124	48225	6	6	5	5	0.37
Chaperonin containing T-complex protein, putative OS=Trypanosoma cruzi (strain CL Brener) GN=Tc00.1047053511725.250 PE=3 SV=1	tr Q4DWG6 Q4DWG6_TRYCC	215	60004	6	6	6	6	0.36
Epsilon tubulin, putative (Fragment) OS=Trypanosoma cruzi GN=TCYLVIO_008641 PE=3 SV=1	tr K4DQL6 K4DQL6_TRYCR	168	42930	4	4	4	4	0.33
ATP-dependent RNA helicase, putative OS=Trypanosoma cruzi GN=TCYLVIO_006093 PE=3 SV=1	tr K4DX70 K4DX70_TRYCR	195	69054	5	5	5	5	0.25
Uncharacterized protein OS=Trypanosoma cruzi Dm28c GN=TCMDM_00673 PE=4 SV=1	tr V5C1A8 V5C1A8_TRYCR	125	52994	3	3	3	3	0.19
Guanine nucleotide-binding protein beta subunit-like protein OS=Trypanosoma cruzi marinkellei GN=MOQ_006544 PE=4 SV=1	tr K2M3V7 K2M3V7_TRYCR	88	56720	3	3	3	3	0.18
Chaperonin alpha subunit, putative OS=Trypanosoma cruzi GN=TCYLVIO_003488 PE=3 SV=1	tr K4E470 K4E470_TRYCR	96	59373	3	3	3	3	0.17
3-methylcrotonyl-CoA carboxylase beta subunit, putative OS=Trypanosoma cruzi GN=TCYLVIO_001675 PE=4 SV=1	tr K4EAH0 K4EAH0_TRYCR	70	67910	3	3	3	3	0.14
Uncharacterized protein OS=Trypanosoma cruzi (strain CL Brener) GN=Tc00.1047053510733.50 PE=4 SV=1	tr Q4D442 Q4D442_TRYCC	121	51159	2	2	2	2	0.13
T-complex protein 1, eta subunit, putative OS=Trypanosoma cruzi marinkellei GN=MOQ_004396 PE=3 SV=1	tr K2M9N1 K2M9N1_TRYCR	68	62000	2	2	2	2	0.1
Protein kinase, putative OS=Trypanosoma cruzi GN=TCYLVIO_010611 PE=3 SV=1	tr K4DJQ7 K4DJQ7_TRYCR	120	64641	2	2	2	2	0.1
Acyl-CoA dehydrogenase, putative OS=Trypanosoma cruzi GN=TCYLVIO_002676 PE=3 SV=1	tr K4E6E2 K4E6E2_TRYCR	64	69407	2	2	2	2	0.09
Uncharacterized protein OS=Trypanosoma cruzi marinkellei GN=MOQ_005375 PE=4 SV=1	tr K2MUN8 K2MUN8_TRYCR	48	45956	1	1	1	1	0.07
Uncharacterized protein OS=Trypanosoma cruzi marinkellei GN=MOQ_008764 PE=4 SV=1	tr K2MPD2 K2MPD2_TRYCR	37	54701	1	1	1	1	0.06
Uncharacterized protein OS=Trypanosoma cruzi Dm28c GN=TCMDM_01704 PE=4 SV=1	tr V5B930 V5B930_TRYCR	50	54013	1	1	1	1	0.06
Glycosyl transferase-like, putative OS=Trypanosoma cruzi GN=TCYLVIO_008189 PE=4 SV=1	tr K4DR88 K4DR88_TRYCR	40	63332	1	1	1	1	0.05
Pumilio/PUF RNA binding protein 4, putative OS=Trypanosoma cruzi GN=TCYLVIO_006426 PE=4 SV=1	tr K4DVY8 K4DVY8_TRYCR	54	66138	1	1	1	1	0.05
T-complex protein 1 subunit alpha OS=Trypanosoma cruzi marinkellei GN=MOQ_002749 PE=3 SV=1	tr K2MDT7 K2MDT7_TRYCR	44	59531	1	1	1	1	0.05
Uncharacterized protein OS=Trypanosoma cruzi GN=TCYLVIO_002612 PE=4 SV=1	tr K4E7V6 K4E7V6_TRYCR	59	59742	1	1	1	1	0.05
Uncharacterized protein OS=Trypanosoma cruzi marinkellei GN=MOQ_003449 PE=4 SV=1	tr K2N2V2 K2N2V2_TRYCR	84	62708	1	1	1	1	0.05
Uncharacterized protein OS=Trypanosoma cruzi (strain CL Brener) GN=Tc00.1047053507569.10 PE=4 SV=1	tr Q4CTC8 Q4CTC8_TRYCC	44	93491	1	1	1	1	0.03
Dynein heavy chain, putative OS=Trypanosoma cruzi marinkellei GN=MOQ_009442 PE=4 SV=1	tr K2MI93 K2MI93_TRYCR	37	542235	1	1	1	1	0.01

APÊNDICE D – IDENTIFICAÇÃO DE API5 DE *T. cruzi*. Em A, é possível verificar uma banda em SDS-PAGE no tamanho aproximado de 60 kDa, na amostra de imunoprecipitação de Sub2, utilizando a condição padronizada e previamente estabelecida (Apêndice C). Esta banda foi excisada do gel com um bisturi (em A), e a proteína contida foi identificada por espectrometria de massas. Em B, estão apresentadas as proteínas identificadas na banda excisada: a mais intensamente identificada foi uma proteína hipotética com tamanho de 60 kDa e apresentando um domínio do tipo API5. Dessa forma, essa proteína hipotética foi denominada de TcAPI5.



APÊNDICE E – PADRONIZAÇÃO DO TAMPÃO DE IMUNOPRECIPITAÇÃO PARA COMPLEXOS CONTENDO Hel45. Em A, B e C, estão apresentadas as imunoprecipitações testes com extrato de parasita selvagem e expressando Hel45 fusionada a GFP. Assim, inicialmente em A e B, foram testados 6 diferentes detergentes em tampão contendo NaCl ou NaCitrate como sal e o resultado mostrou a presença de muitos contaminantes em tampão contendo NaCl. Em C, foram testados menores concentrações de NaCitrate e bandas adicionais foram observadas (entre 50 e 70 kDa) na concentração do tampão de IP de 50 mM de NaCitrate, 50mM; Hepes pH 7,4 20mM; MgCl₂ 1mM; CaCl₂ 10 µM; e TritonX-100 ou BRIJ58 0,1% (em * vermelho). A, B e C.1 - Gel NuPAGE® Novex® 4-12% Bis-Tris (Life Technologies) corado kit Staining with SimplyBlue™ SafeStain (Life technologies). C.2 – Mesmo gel de C.1 corado com kit SilverQuest™ Silver Staining Kit (Life technologies).

An Essential Nuclear Protein in Trypanosomes Is a Component of mRNA Transcription/Export Pathway

Mariana Serpeloni^{1,2}, Carolina Borsoi Moraes³, João Renato Carvalho Muniz⁴, Maria Cristina Machado Motta⁵, Augusto Savio Peixoto Ramos², Rafael Luis Kessler^{1,2}, Alexandre Haruo Inoue^{1,2}, Wanderson Duarte daRocha⁶, Sueli Fumie Yamada-Ogatta⁷, Stenio Perdigão Fragoso², Samuel Goldenberg², Lucio H. Freitas-Junior³, Andréa Rodrigues Ávila^{2*}

1 Departamento de Biologia Celular e Molecular, Universidade Federal do Paraná (UFPR), Curitiba, Brazil, **2** Laboratório de Regulação da Expressão gênica, Instituto Carlos Chagas (ICC), Curitiba, Brazil, **3** Center for Neglected Diseases Drug Discovery (CND3), Institut Pasteur Korea (IPK), Gyeonggi-do, South Korea, **4** University of Oxford, Oxford, United Kingdom, **5** Departamento de Biologia Celular e Parasitologia, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), Rio de Janeiro, Brazil, **6** Departamento de Bioquímica, Universidade Federal do Paraná (UFPR), Curitiba, Brazil, **7** Departamento de Microbiologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina (UEL), Londrina, Brazil

Abstract

In eukaryotic cells, different RNA species are exported from the nucleus via specialized pathways. The mRNA export machinery is highly integrated with mRNA processing, and includes a different set of nuclear transport adaptors as well as other mRNA binding proteins, RNA helicases, and NPC-associated proteins. The protozoan parasite *Trypanosoma cruzi* is the causative agent of Chagas disease, a widespread and neglected human disease which is endemic to Latin America. Gene expression in *Trypanosoma* has unique characteristics, such as constitutive polycistronic transcription of protein-encoding genes and mRNA processing by trans-splicing. In general, post-transcriptional events are the major points for regulation of gene expression in these parasites. However, the export pathway of mRNA from the nucleus is poorly understood. The present study investigated the function of TcSub2, which is a highly conserved protein ortholog to Sub2/ UAP56, a component of the Transcription/Export (TREX) multiprotein complex connecting transcription with mRNA export in yeast/human. Similar to its orthologs, TcSub2 is a nuclear protein, localized in dispersed foci all over the nuclei—except the fibrillar center of nucleolus—and at the interface between dense and non-dense chromatin areas, proposing the association of TcSub2 with transcription/processing sites. These findings were analyzed further by BrUTP incorporation assays and confirmed that TcSub2 is physically associated with active RNA polymerase II (RNA pol II), but not RNA polymerase I (RNA pol I) or Spliced Leader (SL) transcription, demonstrating participation particularly in nuclear mRNA metabolism in *T. cruzi*. The double knockout of the TcSub2 gene is lethal in *T. cruzi*, suggesting it has an essential function. Alternatively, RNA interference assays were performed in *Trypanosoma brucei*. It allowed demonstrating that besides being an essential protein, its knockdown causes mRNA accumulation in the nucleus and decrease of translation levels, reinforcing that Trypanosoma-Sub2 (Tryp-Sub2) is a component of mRNA transcription/export pathway in trypanosomes.

Citation: Serpeloni M, Moraes CB, Muniz JRC, Motta MCM, Ramos ASP, et al. (2011) An Essential Nuclear Protein in Trypanosomes Is a Component of mRNA Transcription/Export Pathway. PLoS ONE 6(6): e20730. doi:10.1371/journal.pone.0020730

Editor: Fabio T. M. Costa, State University of Campinas, Brazil

Received: November 26, 2010; **Accepted:** May 11, 2011; **Published:** June 8, 2011

Copyright: © 2011 Serpeloni et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was funded by grants from the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Fundação Araucária to ARA, grants to SG from Fiocruz and CNPq. MS was funded by a studentship from CNPq and AHI by a studentship from CAPES and CBM and LHFJ were funded by the Ministry of Education, Science and Technology (MEST), the Gyeonggi government, and the Korean Institute of Science and Technology Information from South Korea. SG, SPF and MCM are research fellows from CNPq. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: aravila@fiocruz.br